

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans A. Kretzschmar

Einzelmolekülbasierte Analyse des Aggregationsverhaltens von Tau-Protein und sein Verhalten in der Koaggregation mit α -Synuklein

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Anja Maria Mehle

aus
Dachau

Jahr
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Giese
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Stefan Förster Prof. Dr. Maggie Walter
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. B. Bader
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	16. Januar 2014

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Armin Giese. Für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen, aber vor allem für seine engagierte Betreuung, seine klugen Ratschläge und seinen begeisternden Ideenreichtum möchte ich ihm danken. Sie waren für das Entstehen dieser Arbeit von grundlegender Bedeutung.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Benedikt Bader für seine tatkräftige Einarbeitung und Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit. Doch vor allem möchte ich mich für die geduldige Unterstützung und die stetige Motivation beim Abfassen dieser Arbeit bedanken, die maßgeblich zum Gelingen beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Kretzschmar danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Bei den Mitarbeitern des Labors von Prof. Dr. Giese möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die zahlreichen Hilfestellungen und die Geduld bedanken. Im Besonderen möchte ich Peer Schmitz für die Beseitigung jeglicher Computerprobleme danken, Michael Schmidt für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und die geduldige Beantwortung aller weiteren Fragen sowie Janina Mielke für ihre herzliche Unterstützung. Allen anderen, die ich nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich für die gute Zeit am ZNP, die Freundschaft, Zusammenarbeit, Hilfe und Motivation danken.

Meinen Eltern jedoch gebührt meine größte Dankbarkeit. Danke für Eure immer währende Geduld und Unterstützung, mit der Ihr mich mein ganzes Leben lang umsorgt habt. Eure Liebe und Erziehung sind der Grundstein, auf dem ich aufbauen kann. Meiner Mutter danke ich im Besonderen für Ihre unerschöpfliche Geduld beim Korrekturlesen von der ersten Rohfassung über viele Zwischenstufen bis hin zur vorliegenden Arbeit. Meinem Vater möchte ich für die viele Motivation, seine Geduld und das große Interesse, mit dem er das Voranschreiten meiner Arbeit verfolgte, danken. Auch allen anderen Mitgliedern meiner Familie möchte ich für Ihre Unterstützung, Anregung und Motivation herzlich danken. Und vor allem Dir kleiner Leopold, danke ich für Deine Geduld und Dein Ausharren.

München, 29. Juli 2013

Anja Mehle

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2	Tauopathien und das Tau-Protein	3
1.3	Synukleinopathien und das α -Synuklein-Protein	5
1.4	Schnittstelle zwischen Tauopathien und Synukleinopathien	7
1.5	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	8
1.6	Ziele dieser Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Instrumentarien und Materialien	11
2.2	Medien und Lösungen	16
2.3	Proteinexpression	17
2.3.1	Transformation in Escherischia coli	17
2.3.2	Expression und Aufreinigung der Proteine	18
2.4	Gelelektrophorese und Westernblot	18
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.4.2	Coomassie-Färbung	18
2.4.3	Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mittels Westernblot	19
2.5	Proteinbestimmung	20
2.5.1	Bicinchoninsäure-Assay	20
2.5.2	Bradford-Assay	20
2.5.3	Proteinbestimmung mit einem Coomassie-Gel	21
2.6	Fluoreszenzmarkierung	21
2.6.1	Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe	21
2.6.2	Markierungsansatz	21
2.7	Fibrillen-Herstellung	22
2.7.1	Tau-Fibrillen	22
2.7.2	α -Synuklein-Fibrillen	22
2.8	Thioflavin T Fluoreszenz	23
2.9	Elektronenmikroskopie	23
2.10	Aggregationsansatz für die Einzelpartikelspektroskopie	24
2.10.1	Messbedingungen der Aggregationsansätze	24
2.10.2	Vorbehandlung	25

2.10.3	Tau-Oligomer Aggregationsansatz	25
2.10.4	Tau-Protein und α -Synuklein Koaggregationsansatz	25
2.10.5	Fibrillen Aggregationsansatz	26
2.11	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	26
2.11.1	Messaufbau	27
2.11.2	Justage	28
2.11.3	Softwareanalyse der Messdaten	29
3	Ergebnisse	34
3.1	Proteinexpression	34
3.2	<i>De novo</i> Aggregationsansatz für Tau-Protein und α -Synuklein	35
3.2.1	Aggregationsverhalten von Tau-Protein	35
3.2.2	Aggregationsverhalten von α -Synuklein	35
3.2.3	Aggregationsanalyse von Tau-Protein in Anwesenheit von Metall- ionen	36
3.2.4	Untersuchung der Dynamik oligomerer Tau-Protein-Aggregate . .	40
3.2.5	Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein	44
3.2.6	Untersuchung der Architektur von Koaggregaten mit Hilfe der FRET Analyse	46
3.3	Aggregationsverhalten auf Fibrillenebene	48
3.3.1	Herstellung von Amyloidfibrillen	48
3.3.2	Versuchsdesign	50
3.3.3	α -Synuklein-Fibrillen im homologen System	52
3.3.4	Tau-Fibrillen im homologen System	53
3.3.5	α -Synuklein und Tau-Protein im heterologen System	55
3.3.6	Wirkung von Eisenionen auf das Aggregationsverhalten von Fibrillen	58
3.3.7	Wirkung von Aluminiumionen auf das Aggregationsverhalten von Fibrillen	60
4	Diskussion	62
4.1	Proteinaggregate in der molekularen Pathogenese neurodegenerativer Er- krankungen	62
4.2	Einsatz und Möglichkeiten von FCS und SIFT	63
4.3	Etablierung eines Aggregationsmodells zur Untersuchung der Aggrega- tion und Koaggregation von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillenebene	64
4.4	Das Verhalten von Tau-Protein-Aggregaten	66
4.5	Die Koaggregation von Tau-Protein und α -Synuklein	70
4.5.1	Das Koaggregationsverhalten auf Oligomerebene	71
4.5.2	Das Koaggregationsverhalten auf Fibrillenebene	74
5	Zusammenfassung	76

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	78
Abbildungsverzeichnis	80
Tabellenverzeichnis	85
Literaturverzeichnis	86

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Durch die zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung rücken neurodegenerative Erkrankungen immer mehr in das medizinische und gesundheitspolitische Interesse. Der Morbus Alzheimer ist die häufigste Demenzform [109] und zugleich die häufigste Form der altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen, an der mehrere Millionen Menschen weltweit leiden. Andere neurodegenerative Erkrankungen im Erwachsenenalter, unter anderem die progressive supranukleäre Blicklähmung (engl. *progressive supranuclear palsy*, PSP), die frontotemporale Lobärdegeneration (engl. *frontotemporal lobar degeneration*, FTLD), die kortikobasale Degeneration (engl. *corticobasal degeneration*, CBD), und die Multisystematrophie (engl. *multiple system atrophy*, MSA) gehen neben anderen Symptomen ebenfalls mit kognitiven Beeinträchtigungen einher. Der Morbus Parkinson (engl. *Parkinson's disease*, PD) und die Lewy-Körperchen Demenz (engl. *dementia with Lewy bodies*, DLB) sind klinisch u. a. durch progressive motorische Störungen charakterisiert und entwickeln häufig ebenfalls eine Demenz [45].

Obwohl sich diese Erkrankungen phänotypisch unterscheiden, sind sie alle durch abnorme Proteinablagerungen charakterisiert [177]. Diese sogenannten Aggregopathien zeichnen sich durch extra- und/oder intrazelluläre Ablagerungen von abnormen filamentären amyloiden Proteinaggregaten aus, deren Hauptbestandteil krankheitsspezifische Proteine darstellen [112]. Hierbei werden u. a. intrazelluläre Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein, α -Synuklein, TDP-43 oder FUS (engl. *fused in sarcoma*) gefunden [175, 178, 179, 180, 182]. Zusätzlich können bei neurodegenerativen Erkrankungen extrazelluläre Ablagerungen vorkommen, wie das A β Peptid bei M. Alzheimer oder das Prion-Protein (PrP^{sc}, wobei "sc" für die infektiöse Variante steht) bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung [177]. Daher können diese Krankheiten molekular anhand der jeweilig vorliegenden Proteinablagerungen klassifiziert werden (Abb. 1.1).

Die molekularen Prozesse der Pathogenese dieser neurodegenerativen Krankheiten konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden. So stellt sich unter anderem die Frage, was genau die Entwicklung dieser pathologischen Protein-Polymerisation induziert und beeinflusst. Durch die Forschung finden sich immer mehr Hinweise darauf, dass die Aggregation der Proteine von Monomeren zu Fibrillen einem hierarchischen Aggregationsprozess folgt. Dieser stellt einen komplexen Vorgang dar, der verschiedene Arten von

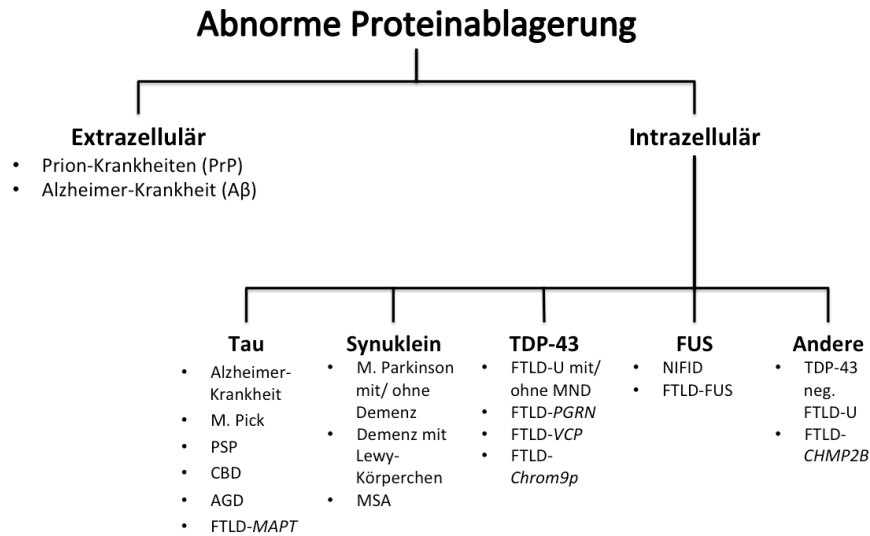


Abb. 1.1: Molekularpathologische Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen (modifiziert nach [177]).

oligomeren Zwischenstufen beinhaltet, die Protofibrillen, Protofilamente oder Oligomere genannt werden [53, 120, 230] und in unterschiedlichen Formationen von Fibrillen und amorphen Aggregaten resultieren [196, 234] (Abb. 1.2).

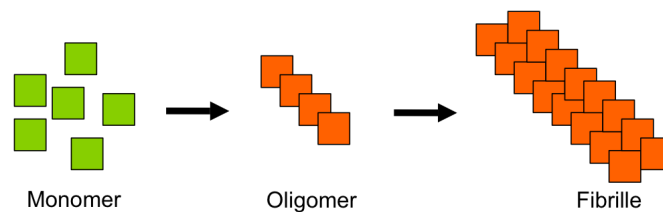


Abb. 1.2: Proteinaggregation. Die Transformation von Monomeren zu Amyloidfibrillen über intermediäre Stufen.

Unklar ist jedoch, ob das Endprodukt, also die fibrillären Amyloidablagerungen, als wesentliches toxisches Agens anzusehen ist oder ob die oligomeren Aggregate ursächlich für die Erkrankung verantwortlich sind [76, 90, 121, 132]. Die Hypothese, dass nicht Amyloidfibrillen oder die großen, lichtmikroskopisch darstellbaren Einschlusskörperchen in Neuronen bzw. Gliazellen, die eigentlich toxische Aggregatspezies ausmachen, sondern kleinere oligomere Zwischenstufen, die Intermediate der Fibrillenbildung [46, 77, 89, 134, 235], ist nicht nur für das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge

wichtig, sondern hat auch für die Identifizierung potentieller therapeutischer Zielstrukturen essentielle Bedeutung [24, 121].

Jedoch sind die molekularen Mechanismen und Reaktionsbedingungen, unter denen krankheitsassoziierte toxische Oligomere entstehen, sowie deren biophysikalische und funktionelle Eigenschaften noch nicht ausreichend erforscht. So ist das Aggregationsverhalten dieser Proteine sowohl auf Oligomer-, als auch auf Fibrillenebene interessanter Gegenstand der Grundlagenforschung und wurde in dieser Arbeit mittels einzelmolekülspektroskopischer Verfahren weiter untersucht.

1.2 Tauopathien und das Tau-Protein

Als Tauopathien bezeichnet man eine Gruppe neurodegenerativer Krankheiten, die neuropathologisch durch prominente intrazelluläre Anreicherung von abnormen Filamenten charakterisiert sind, die aus Tau-Protein bestehen. Diese intrazellulären Einschlüsse des fehlgefalteten Proteins scheinen den gemeinsamen Krankheitsmechanismus darzustellen [78, 79, 223]. Zu diesen gehören unter anderem:

- Morbus Alzheimer (engl. *Alzheimer's disease*, AD)
- frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus in Verbindung mit Chromosom 17 (FTDP-17) [215]
- Morbus Pick
- Silberkornkrankheit (engl. *argyrophilic grain diseases*, AGD)
- kortikobasale Degeneration
- progressive supranukleäre Blicklähmung (PSP) [139, 217].

Die häufigste Tauopathie ist der Morbus Alzheimer. Dies ist eine Erkrankung, die von Alois Alzheimer als neuropsychiatrische Funktionsstörung beschrieben wurde. Betroffen sind vor allem ältere Menschen. Sie tritt meist nach dem 65. Lebensjahr auf und wird heutzutage für circa 60 % der weltweit 24 Millionen an Demenz erkrankten Menschen verantwortlich gemacht [52]. Als pathognomonisches Kennzeichen von AD zählen intrazelluläre neurofibrilläre Tangles (NFTs) in Neuronen vor allem des Hippokampus, des entorrhinalen Kortex und der Amygdala. Diese bestehen aus aggregiertem Tau-Protein [44, 145].

Diese NFTs enthalten hauptsächlich aberrante Filamente, die zu 95 % aus paarigen helikalen Filamenten bestehen (engl. *paired helical filaments*, PHFs), die restlichen 5 % aus geraden Filamenten (engl. *straight filaments*, SFs). PHFs sind zusammengesetzt aus

zwei Filamentfäden, die mit einer Periodizität von 80 nm umeinander gewunden sind und deren Breite von 8 bis 20 nm variiert [39]. Geraden Filamenten hingegen fehlt diese helikale Periodizität [38]. Beide, PHFs und gerade Filamente, sind vorherrschend aus fehlgefaltetem Tau-Protein aufgebaut [84, 124, 126, 137, 236], das abnorm hyperphosphoryliert ist [94, 97, 169, 242].

Unter physiologischen Bedingungen ist Tau-Protein ein lösliches, niedermolekulares, Zytoskelett assoziiertes Phosphoprotein. Es ist 352 – 441 Aminosäuren lang. Im erwachsenen humanen Gehirn kommen sechs Tau Isoformen vor, die durch ein einziges Gen auf Chromosom 17q21 kodiert werden. Dieses besteht aus 16 Exons, wobei das Hauptprotein durch 11 Exons kodiert wird. Die Isoformen entstehen durch alternatives mRNA-Splicing von Exon 2, 3, und 10 [3, 84, 183]. Sie unterscheiden sich durch die Anwesenheit von entweder drei (3-R) oder vier (4-R) carboxyterminalen Tandem-Repeat-Sequenzen und von 31 oder 32 Aminosäuren in der Mikrotubuli-Bindungs-Region [79, 82, 83]. Im normalen Gehirn sowie im Gehirn von Alzheimer Patienten ist das Verhältnis von 3-R-Tau zu 4-R-Tau ausgeglichen [80], wohingegen dieses Verhältnis in vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen verschoben ist [41, 99]. Tau-Protein wird posttranslational modifiziert, indem es auf unterschiedlichen Ebenen phosphoryliert [25], glycosyliert [135], proteolytisch tranktiert [63, 65, 164, 195] und nitriert wird [100]. Es wird reichlich im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und kommt dort vorherrschend in Axonen vor, wohingegen es nur schwer in Astrozyten und Oligodendrozyten des ZNS nachweisbar ist. In den Axonen des peripheren Nervensystems (PNS) ist Tau-Protein ebenfalls nachweisbar [20, 31, 35, 148, 207].

Tau-Protein spielt in einer Vielzahl von Prozessen eine wichtige Rolle. Neben seiner ausschlaggebenden Aufgabe bei der Anordnung der Tubuline und der Polymerisierung und Stabilisierung der Mikrotubuli verbindet Tau-Protein diese Polymere mit anderen zytoskelettalen Filamenten [31, 37, 125, 198, 221, 232] und ist wichtig für das Herauswachsen von Neuriten aus dem Zellkörper [146]. Es konnte beobachtet werden, dass Tau Protein auch an der Migration neuer Neurone beteiligt ist, wobei eine Kolo-kalisation mit Doublecortin eine Rolle zu spielen scheint [59].

Die Funktion von Tau Protein wird durch seine Phosphorylierung reguliert. Im gesunden Gehirn besteht ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tau-Protein, wodurch die Stabilität des Zytoskeletts und damit die axonale Morphologie modelliert wird [151]. Es wurde gezeigt, dass Tau-Proteine innerhalb der NFTs hyperphosphoryliert sind. Da die Phosphorylierungs-Bindungsstellen des Tau-Proteins am zahlreichsten in den Regionen um die Mikrotubuli-Bindungsdomäne herum lokalisiert sind, wird durch eine Zunahme von phosphorylierten Bindungsstellen des Tau-Proteins seine Bindung an die Mikrotubuli negativ reguliert [18, 22, 47, 241]. Durch die Hyperphosphorylierung dissoziiert Tau von den Mikrotubuli, die dabei depolymerisieren, während die Konzentration von freiem löslichem Tau-Protein in den Zellen ansteigt. Es ist

wahrscheinlich, dass die daraus resultierenden höheren zytosolischen Konzentrationen von Tau-Proteinen die Wahrscheinlichkeit der pathologischen Konformationsänderung und Aggregation fördern [129, 130, 196].

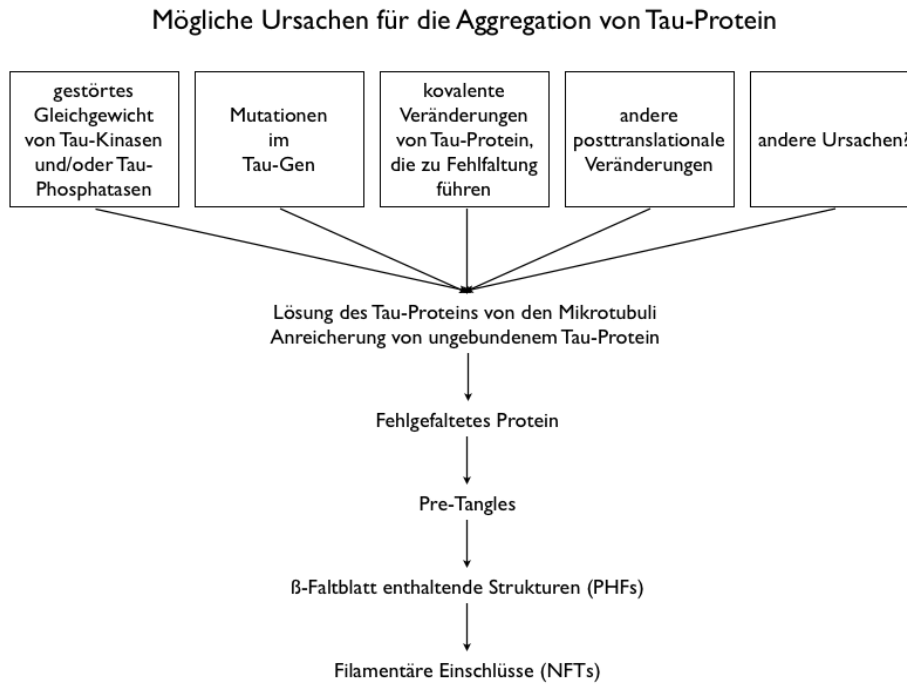


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Stufen der Formation pathologischer Tau-Aggregate [11].

Man geht von unterschiedlichen Kofaktoren aus, die diese Tau-Fibrillisation induzieren können (Abb. 1.3), wie z. B. einem gestörten Gleichgewicht von Tau-Kinasen und Tau-Phosphatasen, Mutationen im Tau-Gen und kovalente Veränderungen, die eine Umfaltung und Aggregation des Tau-Proteins verursachen oder fördern. Frühe Tau-Ablagerungen, die sogenannten *Pre-Tangles*, können mittels Kongorot oder Thioflavin T nicht markiert werden, was als Zeichen dafür gilt, dass diese Intermediate die für amyloide Aggregate typische β -Faltblattstruktur nicht aufweisen. Ein struktureller Wechsel führt zu höher organisierten Aggregaten und zur Entwicklung von neurofibrillären Tangles [11, 61, 130].

1.3 Synukleinopathien und das α -Synuklein-Protein

Der Terminus Synukleinopathie [110] wird verwendet, um eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen zu beschreiben, die durch fibrilläre intrazytoplasmatische Aggregate

von α -Synuklein in bestimmten Neuronen- und Gliazellpopulationen charakterisiert sind [43, 86, 216, 224]. Zu diesen Erkrankungen gehören unter anderem:

- der Morbus Parkinson (PD)
- die Lewy-Körperchen Demenz (DLB)
- die Multisystematrophie (MSA).

Klinisch weisen diese Erkrankungen einen chronischen und progressiven Verlust von motorischen, kognitiven und autonomen Funktionen auf, der von der Verteilung der Läsionen im ZNS abhängt. Wegen der klinischen Überschneidung ist die Differenzialdiagnose manchmal sehr schwierig. Die Hauptläsionen von PD sind intrazytoplasmatische eosinophile Einschlusskörperchen in Neuronen, die Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten genannt werden. Sie können histologisch vor allem in der Substantia nigra und im Locus coeruleus detektiert werden [162]. Sie enthalten das kleine präsynaptische Protein α -Synuklein. Andere Synukleinopathien wie die DLB werden durch Lewy-Körperchen [218] oder wie die MSA durch α -Synuklein enthaltende gliale zytoplasmatische Einschlüsse [224] charakterisiert.

α -Synuklein ist ein präsynaptisches, hitzestabiles, nativ ungefaltetes Protein [40]. Es weist eine Länge von 140 Aminosäuren auf und kommt zahlreich im Gehirn vor, unter anderem in präsynaptischen Endigungen [122], aber auch in Astrozyten und Oligodendroglia [168, 192]. Es gehört einer Familie von Proteinen an, deren physiologische Funktion noch wenig erschlossen ist, wobei vermutet wird, dass α -Synuklein bei der Plastizität des Gehirns [30] und im Dopamin-Haushalt [167, 187] eine Rolle spielt. Es interagiert mit einer großen Anzahl von Proteinen [114, 185], wie auch mit Lipid-Vesikeln [115], und spielt eine Rolle im Lipid-Metabolismus [27, 28]. Man unterscheidet α -, β - und γ -Synukleine [215], wobei nur das α -Synuklein mit filamentären Einschlüssen assoziiert ist, da nur dieses die NAC-Sequenz (engl. *non-A β component*, NAC) besitzt. Ueda hat das 35 Aminosäuren lange Peptid identifiziert [226], das auf den Resten 61 bis 95 des α -Synukleins lokalisiert ist. Es enthält die Domäne, die mit der Aggregation von α -Synuklein in Zusammenhang gebracht wird [105]. Ähnlich wie Tau-Protein geht das α -Synuklein-Molekül in neurodegenerativen Erkrankungen eine Konformationsänderung ein, die sich überwiegend in einer β -Faltblatt Struktur manifestiert, in der die Achse der β -Faltblätter im rechten Winkel zur Faserachse verlaufen [32, 34, 205]. Hierdurch wird seine Polymerisation in außerordentlich stabile Amyloid-Fibrillen ermöglicht [165, 176].

α -Synuklein konnte als Hauptkomponente des histopathologischen Kennzeichens der Lewy-Körperchen identifiziert werden [36, 216, 218]. Lewy-Körperchen sind intrazytoplasmatische Ablagerungen mit einem Durchmesser von 5 - 25 μm , die aus einem dichten Kern aus faserigem und körnigem Material bestehen, der von strahlenförmig angeordneten Filamenten umgeben ist, wodurch die typische Core- und Halo-Struktur

entsteht. Der Hauptbestandteil des faserigen Materials dieser filamentösen Einschlüsse ist α -Synuklein, das durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden kann. Da das Färbemuster der Antikörper sowohl gegen den N- als auch den C-terminalen Bereich des Proteins gleich ist, wird davon ausgegangen, dass das gesamte α -Synuklein-Protein in den Lewy-Körperchen enthalten ist [160].

1.4 Schnittstelle zwischen Tauopathien und Synukleinopathien

Früher wurden Tauopathien und Synukleinopathien als komplett separate Entitäten angesehen [92, 219]. In neueren Studien wurde jedoch gezeigt, dass bei diesen Erkrankungen häufig sowohl eine Überschneidung der klinischen Symptome als auch der histopathologischen Befunde auftritt [60, 67, 128, 155, 184, 233]. So kann die Alzheimer'sche Erkrankung eine α -Synuklein-Pathologie [225] aufzeigen und der Morbus Parkinson und die Demenz mit Lewy-Körperchen eine Alzheimer-Pathologie [42, 113].

Auf molekularer Ebene haben Tau-Protein und α -Synuklein physikalische und biochemische Gemeinsamkeiten [43, 138]. Beide sind in ihrer nativen Form ungefaltete hitzestabile Proteine [220]. Sie kommen zahlreich in Neuronen vor und sind dort vor allem präsynaptisch vorzufinden, wobei Tau-Protein vor allem in den Axonen [20] und α -Synuklein meist in den präsynaptischen Endigungen [106] lokalisiert sind. Und obwohl Tau-Protein und α -Synuklein in normalen Neuronen in verschiedenen Kompartimenten vorkommen, akkumulieren sie in der neurodegenerativen Erkrankung im gleichen Kompartiment [86].

Beide Proteine können polymerisieren und entwickeln sich von Monomeren über intermediäre Zwischenstufen zu Fibrillen und dann zu intrazytoplasmatischen Einschlüssen [25, 229]. Sie aggregieren durch ihre hydrophobe Domäne, die den Kern der daraus resultierenden Fibrillen formen [70, 127]. Die jeweiligen Fibrillen unterliegen posttranslationalen Veränderungen und werden hyperphosphoryliert [25, 58, 88, 93, 102], nitriert [68, 100] und ubiquitiniert [25, 93, 103, 138].

Lewy-Körperchen und andere filamentäre α -Synuklein Einschlüsse können immunhistochemisch in ungefähr 50 % der Alzheimer Fälle nachgewiesen werden. Ob diese α -Synuklein-Einschlüsse zufällig mit der Alzheimer Pathologie verknüpft sind im Sinne einer so genannten „Zuschauer-Pathologie“ (engl. *bystander-pathology*) oder doch zur Bildung von Plaques und Tangles führen, wird diskutiert. Ein Bericht von Frasier et al., 2004 zu diesem Thema zeigt, dass eine Aggregation von α -Synuklein sowohl die Fibrillation als auch die abberante Phosphorylierung von Tau-Protein induzieren konnte [57]. Diese *in vitro* Erkenntnisse werden durch *in vivo* Studien mit transgenen Mäusen unterstützt, die humanes A53T α -Synuklein-Mutanten exprimierten. Diese Mäuse entwickel-

ten einen robusten Synukleinopathie-Phänotyp mit Tau-Einschlüssen [45, 156].

Auch das Tau-Protein kann die Fibrillenbildung von α -Synuklein *in vitro* fördern. So wurde Tau-immunreaktive Pathologie in den Synukleinopathien gefunden. Die Inzidenz von NFTs in Parkinson Erkrankungen ist erheblich höher als in den altersentsprechenden Kontrollgruppen [21]. Tau-immunreaktive Lewy Körperchen wurden in der Medulla von 80 % der Individuen mit sporadischem Parkinson oder einer Demenz mit Lewy Körperchen detektiert, wo Tau-Protein oft in der Peripherie der Lewy Körperchen lokalisiert ist [8, 104]. Werden Tau-Protein und α -Synuklein *in vitro* koinkubiert, können Koagregate detektiert werden im Sinne einer synergistischen Förderung der Fibrillisation beider Proteine [69]. Die Fähigkeit von Tau-Protein und α -Synuklein, sich direkt oder indirekt gegenseitig zu beeinflussen, mag demzufolge zu der Überlappung klinischer und pathologischer Merkmale bei Tauopathien und Synukleinopathien führen [138].

1.5 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Als Hauptmethode dieser Dissertation wurde die konfokale Einzelmolekülspektroskopie verwendet. Die Theorie dieser fluoreszenzbasierten Einzelmolekülspektroskopie wurde bereits 1972/1974 von Elson, Magde und Webb entwickelt [50, 152, 153]. Sie ist eine hochempfindliche optische Messmethode, mit der die Dynamik chemischer Reaktionen im thermodynamischen Gleichgewicht und Diffusionsprozesse auf molekularer Ebene untersucht werden können [6, 7]. Die Analyse von Partikeln, d. h. von fluoreszierenden Molekülen innerhalb eines Messvolumens erfolgt durch die Messung von Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität. Die Informationen können dann aus den Regelmäßigkeiten innerhalb der Signalketten gewonnen werden [50, 152, 194]. Doch erst die Weiterentwicklung und Konstruktion der modernen Lasertechnologie, des präzisen optischen Messaufbaus und des konfokalen Aufbaus der Einzelmolekülspektroskopie ermöglichte es, die Fluktuationen einzelner Moleküle genau zu beobachten [49, 193] und die Methode in weiteren Anwendungsbereichen zu etablieren [203].

Die so gewonnene hohe Sensitivität der Methode, die das Messen von Fluktuationen im nano- und subpicomolaren Konzentrationsbereich ermöglicht [202], sowie die Weiterentwicklung von Auswertungsmethoden und die Einführung des beweglichen Fokus [19] macht diese Methode zu einer äußerst interessanten und in diesem Konzentrationsbereich führenden Methode [154, 202]. Insbesondere eignet sie sich, um Proteinwechselwirkungen im Aggregationsprozess auf Einzelmolekülebene detailliert zu untersuchen.

Im Kapitel Material und Methoden werden der Aufbau der Messgeräte, die Methode selbst und die Analysemöglichkeiten der in dieser Dissertation erhobenen Daten ausführlich erläutert (vgl. Abschnitt 2.11).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Entstehung und Eigenschaften von Tau-Protein-Aggregaten, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese der M. Alzheimer und anderen Tauopathien spielen, auf molekularer Ebene mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie näher zu charakterisieren. Ebenfalls wurde das Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein analysiert, ein Protein, das in der Pathogenese des M. Parkinson und anderen Synukleinopathien eine zentrale Stellung einnimmt.

Folgende grundlagenwissenschaftliche Fragen wurden bearbeitet:

- Wie wirken sich unterschiedliche Milieubedingungen auf das Aggregationsverhalten von Tau-Protein aus? (vgl. Abschnitt 3.2.1 und 4.3)
- Zeigen unterschiedliche Metallionen eine Wirkung auf das Aggregationsverhalten von Tau-Protein? (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 4.4)
- Wie stabil sind oligomere Tau-Intermediate über einen festgelegten Zeitraum? Welche Wirkung hat eine Veränderung der Milieubedingungen auf diese Dynamik? (vgl. Abschnitt 3.2.4 und 4.4)
- Interagieren und koaggregieren Tau-Protein und α -Synuklein miteinander? Unter welchen Milieubedingungen findet dies statt? (vgl. Abschnitt 3.2.5 und 4.5.1)
- Wie sind die Tau-Protein- α -Synuklein-Koaggregate aufgebaut? Lässt sich mit Hilfe der FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) Analyse (vgl. Abschnitt 2.11.3) eine Vorstellung von der Architektur der Koaggregate bzw. der Anordnung der unterschiedlichen Proteinspezies im Aggregat gewinnen? (vgl. Abschnitt 3.2.6 und 4.5.1)

In der Weiterführung obiger Versuchsreihen wurde der *in vitro* Koaggregationsansatz modifiziert, um die Interaktion und das Aggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein auf Fibrillenebene analysieren zu können:

- Lässt sich mit der verwendeten Methode auf Einzelmolekülebene Einblick in das Polymerisationsverhalten der Proteine gewinnen?

- Wie verhalten sich die Proteine auf Fibrillenebene im homologen (Tau-Tau, Synuklein-Synuklein) und im heterologen System (Tau-Synuklein, Synuklein-Tau)? (vgl. Abschnitt 3.3 und 4.5.2)

Hieraus kristallisierten sich die folgenden Fragestellungen:

- Interagieren Monomere und/oder Oligomere im jeweiligen System mit den Fibrillen?
- Lässt sich dieses Verhalten in Abhängigkeit von den Milieubedingungen fördern oder hemmen?
- Welche Unterschiede ergeben sich im Aggregationsverhalten auf Fibrillenebene im homologen oder heterologen System?
- Welche Wirkung haben Eisen- oder Aluminiumionen auf diese Interaktionen?

2 Material und Methoden

2.1 Instrumentarien und Materialien

Im Folgenden sind die in dieser Dissertation verwendeten Instrumentarien, Chemikalien, Materialien und biologischen Substanzen aufgeführt. Die verwendeten Chemikalien besaßen die höchste kommerziell erhältliche Reinheit. Wurden Materialien im Rahmen wissenschaftlicher Kooperation zur Verfügung gestellt, geben entsprechende Abschnitte Auskunft über die Bezugsquellen. Das für Lösungen verwendete Wasser wurde mit einem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitet.

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta Prime (FPLC Apparatur)	GE Healthcare, München, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Chemie Genius 2, Bio Imaging System	Syngene, Cambridge, UK
CP 224 S (Waage)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluorstar Optima	BMG LabTech, Offenburg, Deutschland
French Pressure Cell Press	Thermo IEC, Ashville, NC, USA
Heizblock HBT 130	HLC, Bovenden, Deutschland
Hoefer Semiphor Semidry Westernblot Apparatur	Amersham, Uppsala, Schweden
Inside Reader RR03 und RR04	Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland
Libra 120 Transmissions-Elektronenmikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Luminescence Spektrometer LS 55	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München, Deutschland

Optima TLX Ultracentrifuge	Beckman, Krefeld, Deutschland
Plasmareiniger-Röhre	Eigenbau der AG Baumeister, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
Sorvall Discovery 90 SE	Kendro, Hanau, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Ultrospec 3000 (UV Spektrophotometer)	Pharmacia Biotech, Wien, Österreich
Varioklav (Dampfsterilisator)	H + P, Oberschleissheim, Deutschland

Tabelle 2.3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-N-Morpholinopropansulfon- säure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Nitroblau Tetrazolium- chlorid (NBT)	Roche, Mannheim, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- phosphat (BCIP)	Roche, Mannheim, Deutschland
Acrylamid-Lösung 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumchlorid (AlCl_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bactotrypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2 Material und Methoden

D(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	VWR, Ismaning, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT) 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eisen(III)-chlorid (FeCl_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Igepal CA-630 (NP40 10 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	PeQlab, Erlangen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfer(II)-chlorid (CuCl_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat (CuSO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Manganchlorid (MnCl_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol 99 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland

N,N,N',N'-Tetramethylenethan-1,2-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor mini complete	Roche, Mannheim, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sephadex G15	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Tris Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zinkchlorid (ZnCl_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
15 ml, 50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bioplate 96	Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland
Filterpapier GB 005	Whatman, Dassel, Deutschland
Filtropur-Filter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
karbonisierte Kupfernetzchen (300 x 300 Mesh, ECF300-Cu)	SCI Science Services, München, Deutschland
PD-10-Säulen	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen	Millipore, Schwalbach, Deutschland

P11 Phosphozellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Quarzküvetten	Perkin Elmer, Boston, USA
Reaktionsgefäß 200 μ l	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Reaktionsgefäß 1500 μ l	Eppendorf, Wesseling, Deutschland

Tabelle 2.8: Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester (Alexa 488)	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester (Alexa 647)	Molecular Probes, Eugene, USA
Thioflavin T (ThT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.9: Substanzen für die Proteinanalytik

Substanz	Hersteller
Wildtyp α -Synuklein	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
BL21 (DE3) RIL E. coli Kulturen	Brigitte Kraft, ZNP, LMU, München, Deutschland
hTau 46 cDNA	Prof. Dr. Mauela Neumann, ZNP, LMU, München, Deutschland
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humane Tau-Proteine (T46 Klon) (Primärantikörper)	Zytomed, Berlin, Deutschland
Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse (Sekundärantikörper)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Page Ruler (Westernblot Marker)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.2 Medien und Lösungen

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Stammlösungen und Puffer inklusive ihrer Abkürzungen dargestellt.

Tabelle 2.10: Medien und Lösungen

Abkürzung	Zusammensetzung	pH-Wert	Konz.
AP-Puffer (Alkalische Phosphatase)	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris Base	pH 9,0	
Entfärber-Lösung	25 % Ethanol 8 % Essigsäure		
Laufpuffer	125 mM Tris 960 mM Glycin 0,5 % SDS		5 x
Elutionspuffer	50 mM PIPES 1 mM EGTA 1 mM DTT Proteatse Inhibitor Mini complete nach Volumen (1 Tabl. pro 10 ml Lösung)		
Lämmli-Puffer (low SDS)	25 mM EDTA 0,75 % SDS 50 % Glycerin 1,25 % Bromphenolblau 7,5 % Mercaptoethanol 4 M Harnstoff		10 x
LB Medium (Luria Bertani)	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl Ad 1000 ml H ₂ O		
MT-Puffer (Mikrotubulinpuffer)	80 mM PIPES 1 mM EGTA 0,2 mM MgCl ₂ 1 mM DTT	pH 6,8	
NaPi (50 mM)	Na ₂ HPO ₄ (8,85 g/100 ml) titriert mit NaH ₂ PO ₄ (6,9 g/100 ml)	pH 7,0	

2 Material und Methoden

PBS	100 mM Na ₂ HPO ₄ 17,9 mM KH ₂ PO ₄ 1,36 M NaCl 26,8 mM KCl	pH 7,4	10 x
PBS Tween	PBS 0,1 % Tween20	pH 7,4	
Rich LB Medium	LB Medium 20 ml Glycerin 50 ml K ₂ HPO ₄ (1 M) 50 ml Glucose (20 %) 10 ml MgCl ₂ (1 M) 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) 1 ml Chloramphenicol (34 mg/ml) Ad 1000 ml H ₂ O		
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris	pH 6,8	
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol		
Trenngelpuffer	1,5 M Tris	pH 8,8	

2.3 Proteinexpression

Die Proteinexpression von Tau-Protein wurde selbst durchgeführt. Es wurde die Isoform hTau 46 mittels eines Vektors, den Frau Prof. Dr. Manuela Neumann (ZNP München) zu Verfügung gestellt hat, exprimiert und der E. coli Stamm BL21-Codon Plus (DE3)-RIL mit entsprechenden Plasmiden transformiert.

2.3.1 Transformation in Escherischia coli

Die Durchführung der Transformation in BL21 (DE3) RIL E. coli Zellen erfolgte durch Hinzufügen des Vektors und anschließender Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten auf 42 °C erhitzt, bei 4 °C für 2 Minuten wieder abgekühlt und im Anschluss für 60 Minuten in autoklaviertem LB Medium ohne Antibiotika-Zusatz bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Im Folgenden wurde die Kultur 5 Minuten bei 5000 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet resuspendiert. Dieses wurde dann auf vorgewärmtem LB Medium Agar Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol ausplattiert. Von dieser Übernacht-Kultur ausgehend

wurden mehrere Klone in einer weiteren Übernacht-Flüssigkultur bei 37 °C und 200 rpm in antibiotikahaltigem LB Medium kultiviert.

2.3.2 Expression und Aufreinigung der Proteine

Aus oben beschriebener Kultur wurde im Folgenden eine 1000 ml Rich LB Medium Expressionskultur angeimpft. Das Wachstum konnte über die optische Dichte (OD) bei 600 nm kontrolliert werden. Lagen die OD-Werten zwischen 0,6 und 0,9, konnte die Induktion mit IPTG (1 mM) erfolgen. Im Folgenden wurde die Bakterienkultur nach ca. 2,5 Stunden pelletiert und das Pellet unter Zufügen von Protease Inhibitor mini complete mit Elutionspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Kultur mechanisch mit einer French Press Apparatur lysiert. Zur Abtrennung des Zelldetritus aus dem Lysat wurde die Probe 15 Minuten bei 27.000 g zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,45 µm Filtropur-Filter steril filtriert und im Folgenden in einer FPLC Apparatur über eine P11 Phosphocellulose Kationentauschersäule gebunden. Im Weiteren wurden 2 – 5 ml Fraktionen über einen Salzgradienten von 100 bis 300 mM NaCl in Elutionspuffer eluiert und aus diesen die Fraktionen mit hohem Tau-Protein-Gehalt bestimmt und zusammengeführt. Die Analyse des Gehalts an Tau-Protein erfolgte mittels Westernblot und dem Primärantikörper T46, der gegen Tau Protein gerichtet ist. Durch eine mehrstufige Ammoniumsulfat-Fällung wurden die vereinigten Fraktionen weiter aufgereinigt und für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden sie über eine PD 10 Säule, die mit MT-Puffer äquilibriert wurde, umgepuffert. Zur Darstellung der Produktreinheit wurde eine SDS-PAGE Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.4.1) mit einem 12 % Acrylamid Trenngel durchgeführt, das dann mit Coomassie Brilliant Blue (vgl. Abb. 3.1 und Abschnitt 2.4.2) gefärbt wurde.

2.4 Gelelektrophorese und Westernblot

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet [131]. Dabei wurde das Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem benutzt. Soweit nicht anders angegeben, bestand das Gel aus 1,2 ml Sammelgel und 8 ml Trenngel, welche einen 12 %igen Anteil Acrylamid enthielten.

2.4.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde zur Visualisierung und Quantifizierung von Proteinen nach einer Gelelektrophorese durchgeführt. Die polyaromatischen Sulfonat-Gruppen der

Coomassie Farbe (Coomassie Brilliant Blue R250) lagern sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färben damit unspezifisch Proteine. Das Polyacrylamid-Gel wurde 20 Minuten lang in einer Coomassie Lösung bei Raumtemperatur angefärbt und anschließend über Nacht in Entfärberlösung wieder entfärbt und im Folgenden ausgewertet (vgl. 3.1).

2.4.3 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mittels Westernblot

Der Westernblot dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens mit Hilfe eines monoklonalen oder polyklonalen primären Antikörpers. Die Detektion der Proteine erfolgt über einen sekundären Antikörper, der den primären Antikörper erkennt. Hierfür wurde eine PVDF Membran mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ verwendet, die mit 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit Transferpuffer äquilibriert wurde. Die Membran wurde auf zwei Lagen in Transferpuffer getränktem Gel Blotting Filterpapier aufgelegt, auf diese das Gel (von dem das Sammelgel zuvor abgetrennt wurde) und darauf wiederum zwei Lagen des Filterpapiers aufgeschichtet. Während des Aufbaus der einzelnen Schichten wurde die Bildung von Blasen vermieden, indem diese mit Hilfe eines runden Stabes „herausgerollt“ wurden. Der elektrophoretische Transfer wurde in einer Hoefer Semiphor Semidry Westernblot Apparatur durchgeführt, in der die einzelnen Schichten so angeordnet wurden, dass die PVDF Membran näher zur Anode platziert wurde. Für den Transfer wurde eine Stromstärke von $0,8\ \text{mA}/\text{cm}^2$ für ca. 2 Stunden angelegt. Nach Abschluss des Transferprozesses wurden die freien Proteinbindungsstellen der PVDF Membran mittels 5 % Milchpulver in PBS Tween geblockt. Über Nacht erfolgte bei $4\ ^\circ\text{C}$ die Detektion mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane Tau-Proteine (T46 Klon) in 1 % Milchpulver in PBS Tween. Nach Entfernen der Primärantikörperlösung wurde die Membran dreimal mit PBS Tween oder 1 % Milchpulver in PBS Tween für je 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung mit einem Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse (Sekundär Antikörper) in PBS Tween oder 1 % Milchpulver in PBS Tween für 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen, dem sich drei Waschzyklen in PBS Tween oder 1 % Milchpulver in PBS Tween für je 15 Minuten bei Raumtemperatur anschlossen. Um die Membran zu äquilibrieren, wurde sie 5 Minuten in AP-Puffer gelegt. Für die Visualisierung der Proteine auf der Membran wurden $35\ \mu\text{l}$ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP, 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid) und $45\ \mu\text{l}$ 4-Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT, 75 mg/ml in 75 % Dimethylformamid) in 10 ml AP-Puffer hinzugefügt und die Membran bis zur gewünschten Bandenintensität darin belassen.

2.5 Proteinbestimmung

2.5.1 Bicinchoninsäure-Assay

Die quantitative und photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA (Bicinchonin Säure) Methode [213]. Diese ist ein Proteinbestimmungs-Assay, der sich im Gegensatz zu anderen Methoden durch hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit auszeichnet. Sie ist mit vielen ionischen und nichtionischen Detergenzien kompatibel. Das Prinzip basiert darauf, dass zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) in alkalischem Milieu quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen reduziert werden (Cu^{1+}). Die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin sowie die Peptidbindung an sich sind für die Reduktion innerhalb des Proteins verantwortlich. Das Salz der Bicinchoninsäure geht zusammen mit den gebildeten einwertigen Kupferionen in alkalischem Milieu einen intensiv pupurfarbenen Komplex ein, dessen Farbintensität mit der Proteinkonzentration korreliert. Die Entstehung dieser Komplexe kann mit einem geeigneten Photometer nachgewiesen werden, wobei das Absorptionsmaximum bei 562 nm detektiert wird und proportional zur Proteinkonzentration ist. So wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:15 mit der BCA-Stammlösung, die zuvor 50:1 mit konzentriertem Kupfersulfat gemischt wurde, in einer Multiwellplatte mit durchsichtigem Boden vermischt. Als Kalibrationsstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (Bovines Serum Albumin) von 0 – 1 mg/ml verwendet. Diese Proben wurden nach dem Mischen bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und danach photometrisch auf einem Fluostar Optima (BMG Labtech) ELISA Reader in Doppelansätzen bestimmt und arithmetisch gemittelt.

2.5.2 Bradford-Assay

Eine weitere Methode zur quantitativen Proteinbestimmung war der Bradford-Test, der sich durch seine Schnelligkeit und hohe Spezifität sowie Sensitivität gegenüber Proteinen auszeichnet. Jedoch läuft die Reaktion in saurem Milieu ab, in dem viele Proteine ausfallen. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250 bildet Komplexe mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine. Bei photometrischer Detektion der ungebundenen roten Farbe liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 465 nm. Durch Zugabe der Proteine und der daraus entstehenden Komplexbildung geht der Farbstoff in eine blaue, unprotonierte, anionische Sulfatform über, in der er stabilisiert wird. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsspektrum auf 595 nm. Die Zunahme des Extinktionskoeffizienten bei 595 nm, der bei den sich bildenden Komplexen sehr viel höher ist als bei dem freien Farbstoff, ist ein Maß für die Konzentration der Proteine in der Lösung.

2.5.3 Proteinbestimmung mit einem Coomassie-Gel

Es wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, in der die zu untersuchenden Proteinproben und eine BSA-Standardreihe mit den Konzentrationen 1 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,1 mg/ml auf das Gel aufgetragen wurden. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel Coomassie Blue gefärbt (vgl. Abschnitt 2.4.2), digitalisiert (ChemiGenius, Bio Imaging System) und mittels des *Gene Snap Programmes* quantitativ ausgewertet (vgl. Abb. 3.1 und Abschnitt 3.1).

2.6 Fluoreszenzmarkierung

2.6.1 Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe

Um das Aggregationsverhalten mittels einzelmolekülspektroskopischer Verfahren zu untersuchen, wurden Tau-Protein und α -Synuklein mit den Fluoreszenzfarbstoffen AlexaFluor488-O-Succinimidylester (Alexa488) und AlexaFluor-647-O-Succinimidylester (Alexa647) markiert. Diese Farbstoffe können sowohl mit den primären Aminogruppen der im Protein enthaltenen Lysinreste als auch mit den endständigen Aminogruppen des N-Terminus kovalente Bindungen eingehen. Es entstehen stabile Farbstoff-Protein-Konjugate. Sie gehen nur in sehr geringem Maß Bindungen mit aromatischen Aminen, Alkohol- und Phenolgruppen ein. Eine weitere Eigenschaft besteht darin, dass sie in einem pH Bereich zwischen 4 – 10 gleiche Farbstoffeigenschaften zeigen. Fluorophorstammlösungen und Fluorophorkonjugate wurden innerhalb der Versuche dieser Arbeit bis unmittelbar vor Gebrauch lichtgeschützt aufbewahrt.

2.6.2 Markierungsansatz

Um die Tau-Proteine nach der Proteinexpression mit den Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, wurden, wie oben beschrieben, die freien primären Aminogruppen der Proteine mit den Fluorophoren Alexa488 bzw. Alexa647 markiert. Der Farbstofflösung wurde je nach eingesetztem Farbstoff ein Volumenanteil von 10 % einer 1 M Na_2CO_3 -Lösung (pH 8.3) in geeignetem molaren Verhältnis zur Proteinlösung zugefügt. Durch die Anwesenheit der Na_2CO_3 -Lösung konnte durch Alkalisierung der Proteinlösung ein geeignetes Reaktionsmilieu geschaffen werden. Somit wurde die Bindung der Succinimidylester an die Proteine in einem Milieu mit pH 7.5 – 8.5 ermöglicht. Nach 10 – 12 Stunden Reaktionszeit bei 4 °C wurde die Bindungsreaktion gestoppt. Dies erfolgte durch sofortige Abtrennung des freien Farbstoffes, was in Microsporin Säulen über Sephadex G15 mit 50 mM NaPi-Puffer (pH 7) äquilibriert geschah. Dabei wurde die Abtrennung freier Succinimidylester-Farbstoffe aus dem Proteinansatz zweimal mittels frischem Sephadex Microsporin inklusive zweimaliger Zentrifugation bei 2800 1/min für 2 Minuten und dazwischen mit Spülen in 10 μl Puffer wiederholt.

Um eine ausführliche Kontrolle der Qualität der so hergestellten Farbstoff-Protein-Konjugate zu gewährleisten, wurden sie mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie in Bezug auf die Menge, die Reinheit, den prozentualen Anteil des freien Farbstoffs und die Diffusionszeit geprüft und mit vergleichbaren Daten abgeglichen [10, 98]. Im Anschluss wurden die markierten Proteinstammlösungen aliquotiert und bei minus 80 °C vor Licht geschützt bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.7 Fibrillen-Herstellung

2.7.1 Tau-Fibrillen

Die Aggregation von Tau-Proteinen wurde nach einem bereits etablierten *in vitro* Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manuela Neumann (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP), Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München) durchgeführt [87, 181]. Zur Anwendung kam rekombinantes Tau-Protein, welches für diese Arbeit zuvor exprimiert wurde (vgl. Abschnitt 2.3). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647 markiertes hTau 46 (0,1 mg/ml in Tris-Puffer 50 mM) und unmarkiertes hTau 46 (2 mg/ml in Tris-Puffer 50 mM) wurden im Verhältnis 1:1000 (markiertes Protein zu unmarkiertem Protein) in MOPS-Puffer (300 mM) und Heparin (1 mg/ml) als Kofaktor bei 37 °C, 700 rpm unter ständigem Schütteln über mehrere Tage inkubiert (Endkonzentration Tau-Protein ca. 0,2 mg/ml) (Abb. 2.1). Dem Ansatz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels der Thioflavin T Fluoreszenz untersucht (vgl. Abb. 3.17).

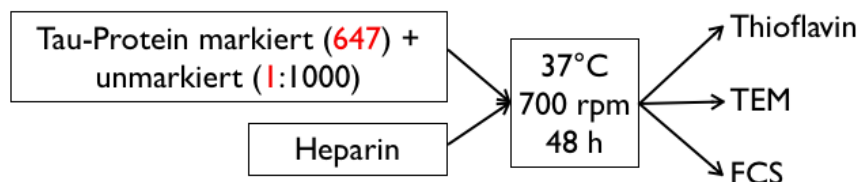


Abb. 2.1: Herstellung von Tau-Fibrillen.

2.7.2 α -Synuklein-Fibrillen

Die Aggregation von α -Synuklein wurde nach einem bereits etablierten *in vitro* Protokoll der Arbeitsgruppe von Philipp Kahle (Adolf-Butenandt-Institut, LMU München) durchgeführt [116]. Es wurde rekombinantes Wildtyp α -Synuklein in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647 markiertes α -Synuklein

(0,04 mg/ml) und unmarkiertes α -Synuklein (1 mg/ml) wurden im molaren Verhältnis 1:1000 (markiertes Protein zu unmarkiertem Protein) bei 37 °C, 700 rpm unter ständigem Schütteln inkubiert (Abb. 2.2). Nach mehrmaligen Kontrollmessungen mittels der Thioflavin T Fluoreszenz und einer Latenzzeit von mehreren Wochen (über 28 Tage) konnten fibrilläre Aggregate detektiert werden (vgl. Abb. 3.19).

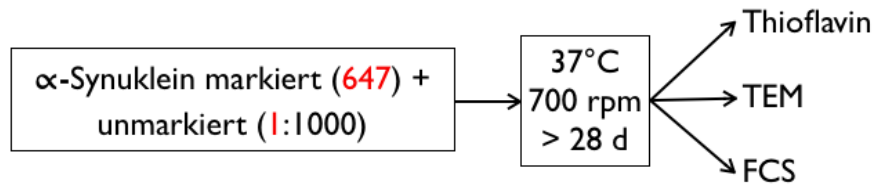


Abb. 2.2: Herstellung von α -Synuklein-Fibrillen.

2.8 Thioflavin T Fluoreszenz

Um den fibrillären Aufbau der unter Abschnitt 2.7 hergestellten amyloiden Aggregate nachzuweisen, wurde Thioflavin T (ThT) verwendet. Für Thioflavin T ist bekannt, dass es mit fibrillären Aggregaten eine spezifische Bindung eingeht [12, 142, 174, 227], die durch Anregung bei 450 nm ein Emissionsmaximum bei 482 nm aufweist. Dabei ist die Fluoreszenz von der Bindung an die Amyloidfibrillen und von der Konzentration dieser sowie dem pH-Wert des Umgebungsmilieus abhängig (max. Fluoreszenzeffektivität bei pH 9,0). Die Detektion der Thioflavin T Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines LS-55 Lumineszenz Spektrometers durchgeführt. Hierfür wurden Quarz Küvetten mit einer Exzitationspfadlänge von 1 cm befüllt. Dies geschah mit 470 μ l NaPi Puffer, 25 μ l Thioflavin T Stammlösung (1 mM) und 5 μ l Probenvolumen aus dem Fibrillen-Aggregationsansatz (vgl. 2.7). Unter konstantem Rühren wurde der Inhalt der Quarz Küvette mit einer optischen Wellenlänge von 450 nm angeregt und die Emission bei 490 nm gemessen (vgl. Abschnitt 3.3.1, Abb. 3.17 und Abb. 3.19).

2.9 Elektronenmikroskopie

Die entsprechend Abschnitt 2.7 hergestellten Fibrillen wurden mittels der Elektronenmikroskopie visualisiert. Diese Aufnahmen wurden mit einem Libra 120 Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommen. In Vorbereitung für die Aufnahmen wurden 5 μ l Proben aus dem jeweiligen Fibrillen-Aggregationsansatz auf Parafilm aufgetragen und 60 Sekunden mit einem karbonisierten Kupfernetzchen (300 x 300 Mesh, ECF300-Cu,

SCI Science Services, München, Deutschland) überschichtet. Um die Anheftung der Proteine zu verbessern, wurde die Oberfläche dieser Kupfernetzchen kurz vor Verwendung für 60 Sekunden in einer Plasmareiniger-Röhre elektrostatisch geladen. Nachdem die Probe bei Raumluft angetrocknet war, wurden die Kupfernetzchen erneut für 60 Sekunden mit 5 μl einer 2 %igen Uranylacetat Lösung überschichtet. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit Hilfe von Zellstoff abgenommen und erneut bei Raumluft getrocknet. Nun konnten die vorbereiteten Kupfernetzchen in den Strahlengang des Elektronenmikroskops eingeführt werden und die Fibrillen dargestellt werden (vgl. Abschnitt 3.3.1, Abb. 3.18 und 3.20).

2.10 Aggregationsansatz für die Einzelpartikelspektroskopie

Der *de novo* Aggregationsansatz für Proteine, anwendbar auf dem Gebiet einzelmolekülspektroskopischer Verfahren, war von B. Bader für α -Synuklein und von S. Nobile für Tau-Protein im Rahmen ihrer jeweiligen Dissertation am ZNP entwickelt worden [10]. Diese Ansätze wurden in dieser Arbeit reproduziert, als Grundlage der durchgeführten Experimente verwendet und entsprechend der Fragestellungen dieser Dissertation weiterentwickelt.

Als Darstellungsform werden in dieser Arbeit hauptsächlich zweidimensionale Intensitätshistogramme verwendet, die auf Grund ihrer Anschaulichkeit die Verständlichkeit der durchgeführten Versuche fördern. Zur näheren Erklärung und genauen Interpretation der so genannten „Punktwolken“ siehe Abbildung 2.4 (vgl. Abschnitt 2.11.3) und Abbildung 2.5 (vgl. Abschnitt 2.11.3).

2.10.1 Messbedingungen der Aggregationsansätze

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Versuche auf Basis der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie unter folgenden gleichen Voraussetzungen durchgeführt:

- Die Versuche fanden bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) statt.
- Die Ansätze wurden in einer Bioplate 96 mit 96 Probefeldern als 20 μl Reaktionsansatz inkubiert und mit TESA Klebefilm zur Vermeidung von Verdunstungseffekten versiegelt.
- Die Messzeit der zu untersuchenden Proben betrug in der Regel 10 - 15 Sekunden pro Einzelmessung.
- Jede Probe wurde über einen Zeitraum von 12 Messwiederholungen analysiert.

- Sämtliche Versuche dieser Arbeit wurden sowohl mehrmals (mindestens 3 Mal) als auch in Mehrfachbestimmung (2 - 4-fach Bestimmungen) durchgeführt.
- Mit Ausnahme der Fluoreszenzfarbstoffe wurden keine weiteren fluoreszierenden Chemikalien verwendet.
- Die 2D-FIDA-Intensitätshistogramme dieser Arbeit (vgl. Abschnitt 2.4) repräsentieren die Summe von sechs konsekutiven Einzelmessungen mit einer Messzeit von insgesamt 60 Sekunden pro Histogramm.

2.10.2 Vorbehandlung

Um von einer *de novo* Aggregation ausgehen zu können, wurde nach dem Auftauen der Tau-Protein Stammlösung eventuell präformierte Aggregate mit der Optima TLX Ultracentrifuge bei 1×10^5 g, 4 °C für 30 Minuten pelletiert. Der nun nahezu aggregatfreie Überstand wurde für die Versuche verwendet.

2.10.3 Tau-Oligomer Aggregationsansatz

Für die Charakterisierung von Aggregationsvorgängen im oligomeren Bereich wurden Tau-Proteine in einer Konzentration von ca. 2 – 4 nM verwendet. Die Proteine waren entweder mit roten (Alexa647) oder grünen (Alexa488) Fluorophormarkierungen versehen. Die Proteine wurden in einer 5-fach Stammlösung in Tris-Puffer 0,05 M bei pH 7,0 angesetzt. Fakultativ wurde diesem *in vitro* Ansatz die organischen Lösungsmittel Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen (5 %, 10 %, 20 %), DMSO (1 %) oder das Detergens NP40 (0,1 %) hinzugefügt, um das Aggregationsverhalten unter verschiedenen Milieubedingungen beobachten zu können. Auch wurde der Ansatz in Anwesenheit von unterschiedlichen Metallionen untersucht, wie AlCl_3 , CaCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , MgCl_2 , MnCl_2 und ZnCl_2 in Konzentrationen von 0,03 – 30 μM , um deren Einfluss auf die Aggregation zu beobachten.

Für den Ansatz zum Versuch „Die Untersuchung von Dynamiken oligomerer Tau-Protein-Aggregate“ (vgl. Abschnitt 3.2.4) war vor allem die Beobachtung über die Zeit wichtig. So wurde diese Versuchsreihe über 4 Stunden gemessen, was entsprechend der Befüllung der Bioplate 96 entweder 40 oder 80 Messwiederholungen entsprach.

2.10.4 Tau-Protein und α -Synuklein Koaggregationsansatz

Ein *in vitro* Ansatz wurde entwickelt, um Tau-Protein und α -Synuklein miteinander kombinieren zu können, um das Koaggregationsverhalten der beiden Proteine zu untersuchen. Tau-Protein wurde entsprechend dem Tau Oligomer Aggregationsansatz (vgl. Abschnitt 2.10.3) verwendet. α -Synuklein wurde bei einer Konzentration von 4 – 8 nM

mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa647 oder Alexa488 markiert verwendet. Die Proteine wurden ebenfalls in einer 5-fach Stammlösung in Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,0) angesetzt und für diese Versuchsreihe miteinander vermischt. Sie wurden gemeinsam in Gegenwart unterschiedlicher Ethanol-Konzentrationen (5 %, 10 %, 20 %), DMSO (1 %) oder NP40 (0,1 %) auf ihr Aggregationsverhalten untersucht.

Von großer Bedeutung für die Koaggregation war es, das Verhältnis der Partikelzahl N der beiden unterschiedlich großen Proteine äquivalent zueinander einzustellen, um in den Versuchen aussagekräftige Messdaten erlangen zu können. Dies wurde in so genannten „Vor-Versuchen“ (nicht gezeigt) vor jedem Versuch individuell durchgeführt. Im Mittel betrug das eingesetzte Verhältnis der Partikelzahl N für Tau-Protein zu α -Synuklein 1 zu 5 - 10 und wurde optisch mit Hilfe der 2D-FIDA-Histogramme (vgl. Abbildung 2.4) nach ihrer Aggregation abgeglichen.

2.10.5 Fibrillen Aggregationsansatz

Für die *in vitro* Versuche zum Aggregationsverhalten auf Fibrillenebene wurden Tau-Protein und α -Synuklein, die als Monomere vorlagen, mit zuvor hergestellten amyloiden Fibrillen (vgl. Abschnitt 2.7) gemeinsam im Ansatz untersucht. Die Fibrillen wurden hierfür in einer Verdünnung von 1 : 80 verwendet. Fakultativ wurden auch hier die Milieubedingungen mit Hilfe von DMSO (1 %), NP40 (0,1 %) und den dreiwertigen Ionen Aluminium und Eisen (10 μ M) verändert.

Die Versuchsreihe zur „Aggregation auf Fibrillenebene“ (vgl. Abschnitt 3.3) war vom Versuchsaufbau sehr komplex. Wie in Abbildung 3.21 dargestellt, wurde zuerst die Bio-plate 96 in einem 4-fach Ansatz nach Protokoll mit den Tau-Protein- oder α -Synuklein-Monomeren und Puffer befüllt. Wahlweise wurden ebenfalls DMSO (1 %) und/oder NP40 (0,1 %) hinzugefügt. Es wurde für einen Zeitraum von 30 Minuten die DMSO-induzierte Bildung von Oligomeren abgewartet. Dann wurden die vorgefertigten Fibrillen und wahlweise DMSO hinzugefügt und der Messvorgang sofort nach Beendigung des Pipettiervorgangs gestartet. In einer ersten Messung wurde dieser Ansatz über einen Zeitraum von 2 Stunden bzw. 6 Messwiederholungen gemessen. Im Anschluss wurden die Metalle Eisen und Aluminium hinzugefügt, um in einer zweiten Messung über einen Zeitraum von weiteren 2 Stunden bzw. 6 Messwiederholungen ihren Effekt zu untersuchen.

2.11 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um auf Einzelmolekülebene das Aggregationsverhalten von Tau-Protein und das Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein näher zu charakterisieren. Diese Methode er-

möglicht eine differenzierte Betrachtung von Proteinaggregaten, unter anderem durch ihre zahlreichen Analyseverfahren, wie der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), der Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse (engl. *fluorescence intensity distribution analysis*, FIDA) und das Scannen nach intensiv fluoreszierenden Zielstrukturen (engl. *scanning for intensely fluorescent targets*, SIFT), deren theoretisches Konzept ausführlich von Schwille [9, 201, 203], Kask [118, 119], Giese und Bieschke [19, 74] beschrieben wurde. Im folgenden Abschnitt wird kurz auf das Prinzip der Methode und der in dieser Arbeit verwendeten Analyseverfahren eingegangen.

2.11.1 Messaufbau

Für die mit konfokaler Einzelmolekülspektroskopie durchgeführten Messungen wurden ein Insight Reader verwendet. Mit diesem Gerät können FCS- und SIFT-Messungen erhoben werden. Die Grundlage für dieses Gerät bildet ein konfokales Mikroskop mit einer motorisierten Steuereinheit [19, 72]. Das Anregungslicht, in diesem Fall Laserlicht eines Argon-Ionen-Lasers der optischen Wellenlänge 488 nm und eines Helium-Neon-Lasers der optischen Wellenlänge 633 nm, wird mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektivs (40x; Olympus, Japan) hoher numerischer Apertur (1,2) in die Probe fokussiert, sodass ein möglichst kleines Anregungsvolumen (ca. 1 Femtoliter) entsteht. Diffundieren nun fluoreszenzaktive Teilchen in das Anregungsvolumen, werden sie dort zur Fluoreszenz angeregt. Die hierbei emittierten Photonen werden mit Hilfe zweier dichroischer Spiegel und einer Lochblende (engl. *pinhole*, Durchmesser 70 μm) vom Anregungslicht separiert, passieren retrograd zum Anregungslicht den Strahlteiler und werden dann, getrennt über zwei Einzelphotonendetektoren (Avalanche-Photodioden), aufgezeichnet (Abb. 2.3). Als Probenträger werden 96-Multiwell-Platten (Bioplatte 96) verwendet, die mit einem Metallrahmen zum Schutz vor Verformung ausgestattet sind und zudem über einen durchsichtigen Boden verfügen, um eine optimale Qualität der Messung zu gewährleisten. In einem Well kann ein Probenvolumen von maximal 30 μl untersucht werden. Die Position des Laserfokus kann optisch mittels einer mechanisch über Spiegel zuschaltbaren Videokamera überprüft werden. Optimal wird der Focus 150 μm über dem Glasboden der Probenträger in der Messlösung positioniert. Das offene Messsystem wird durch die Brennpunkte der beiden Laser beschrieben, die sich überlagern. Hierbei ist aus physikalischen Gründen der Radius des grünen (488 nm) Fokus etwas kleiner als der des roten (633 nm) Fokus, wobei die optische Apparatur den grünen Laserfokus vollständig innerhalb des roten Fokus abbildet, auch wenn ihre Mittelpunkte bis zu 50 nm voneinander abweichen können. Mittels der Anregung über Laser unterschiedlicher Wellenlänge und der Detektion mit zwei Einzelphotonendetektoren wird die Möglichkeit gegeben, das Fluoreszenzsignal in zwei Kanälen separat voneinander und zugleich parallel zueinander zu detektieren und auszuwerten. Lineare Messergebnisse werden dadurch gewährleistet, dass die Messungen in einem Bereich bis 100 kHz Gesamthelligkeit liegen. Dieser Bereich sollte auch nicht überschritten werden, um die Totzeit der Detektoren nicht zu erreichen.

und um eine gute Auswertbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Mit der *FCS+Plus Control* Software wurden sowohl die hochpräzisen Motorsteuerungssysteme und Mikroschrittmotoren für den Probenträgertisch als auch die Positionen der Laserfoci und der Lochblende am Insight Reader gesteuert.

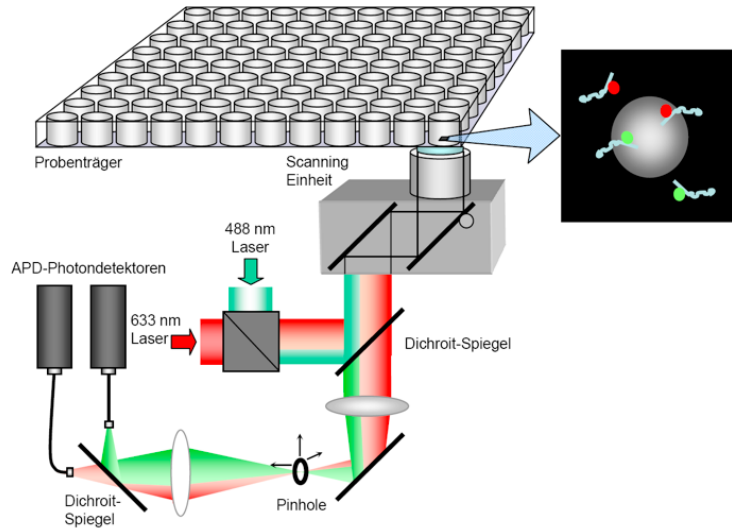


Abb. 2.3: Schematischer Messaufbau eines Insight Readers mit einem Multiwell-Probenträger (modifiziert nach [73]).

2.11.2 Justage

Inbetriebnahme und Justage des Insight Readers erfolgten stets nach einem festen Schema. Um eine konstante Anregungsenergie des Argon-Ionen-Lasers und des Helium-Neon-Lasers zu garantieren, wurden diese mindestens 30 Minuten vor Beginn der Messungen eingeschaltet. Nach dieser Aufwärmzeit wurden die Laserleistungen mittels eines in den Strahlengang eingeschobenen Detektors separat gemessen und auf die Anregungsleistungen von $200 \mu\text{W}$ für den 488 nm Laser bzw. $300 \mu\text{W}$ für den 633 nm Laser eingestellt. Danach wurden die Lochblende und die Glasfaserleitungen für jede Messung neu justiert, sowie der optische Korrekturring am Objektiv neu eingestellt. Hierfür wurde als Referenzwert der Justage eine Messlösung aus den freien Farbstoffen Alexa488 und Alexa647 verwendet, deren Farbstoffmessparameter bekannt waren. Um einen sinnvollen Vergleich der Justageeinstellungen zu sichern und die Fokusabbildung zu optimieren, wurden folgende Parameter überprüft:

- Die CPP (engl. *counts per particle*) als Maß für die Helligkeit der einzelnen Farbstoffmoleküle unabhängig von deren Farbstoffkonzentration in der Eichlösung.

- Die Diffusionszeit (T_{diff}) der Farbstoffmoleküle, mit der sich die Abbildungsschärfe des Lasermessfokusses bestimmen lässt, da bei unscharfer Abbildung detektable Teilchen scheinbar langsamer durch den Fokus diffundieren.

Es wurde für jeden Messtag eine Justagemessung durchgeführt. Die entsprechenden Werte und Einstellungen am Gerät wurden zu Kontrollzwecken notiert (nicht gezeigt). Ein festgesetzter Wert wurde für die Länge des „Scan-Pfades“ ($100\ \mu\text{m}$), die Frequenz des mobilen Fokus (Beams Scanner; 50 Hz) und die Distanz der Probenstischverschiebung ($2000\ \mu\text{m}$) eingestellt.

2.11.3 Softwareanalyse der Messdaten

Bei fast allen Messungen dieser Arbeit, die auf konfokaler Einzelmolekülspektroskopie basieren, wurden die Daten mittels dem SIFT Verfahren gewonnen, einer Messmethode zur Detektion von Einzelmolekülen und Aggregaten. Die theoretischen Grundlagen des SIFT Verfahrens finden sich in allen Einzelheiten bei Bieschke und Giese [19]. Die so gewonnenen Daten wurden mittels der FIDA Auswertung, der SIFT Auswertung und der FRET Analyse weiter untersucht.

SIFT Verfahren

Für die Detektion von Daten mit dem SIFT Verfahren wird ein mobiler Fokus eingesetzt. Dieser mäandriert pro Messung einmal durch das Messgefäß und wird im für diese Arbeit verwendeten Insight Reader durch einen Beams Scanner realisiert [72, 75]. Dadurch wird das zu untersuchende Volumen und daraus folgend die Sensitivität der Messtechnik in Bezug auf seltene, große und langsame Teilchen, wie z. B. Proteinaggregate, stark erhöht. Der mobile Fokus erhöht die Detektionseffizienz erheblich, wodurch mit dem SIFT Verfahren sehr geringe Partikelkonzentrationen gemessen werden können, deren untere Grenze im femtomolaren Bereich liegt. Diese Grenze ist stark von der Helligkeit der gesuchten Teilchen abhängig. Für sehr helle Teilchen befindet sich die Detektionsgrenze sogar im attomolaren Bereich [19, 74].

Die Daten der Fluoreszenzmessung werden in sukzessiv aufgezeichnete Zeitintervalle mit einer Länge von $40\ \mu\text{s}$ unterteilt. Diese Intervalle werden im Folgenden „Bins“ genannt. Das hochintense Signal der mehrfach markierten Zielmoleküle kann anhand der Intensitätsverteilung vom Hintergrundsignal analytisch abgetrennt werden. Die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus wird für große, sehr langsam diffundierende Zielmoleküle nicht mehr durch ihre Diffusionszeit definiert, sondern vor allem durch die Scangeschwindigkeit. Hieraus resultiert, dass die Zielmoleküle in der gleichen Zahl Bins abgebildet werden. Die Anzahl von Bins wird somit als direktes Maß für die Konzentration hochmarkierter Zielmoleküle gewertet.

Der Insight Reader ermöglicht zudem eine zwei Farben SIFT. Dies ist die simultane Analyse von zwei unterschiedlich markierten fluoreszierenden Sonden, die im selben Probevolumen gemessen werden. Die in dieser Arbeit so gewonnenen Daten wurden in einen zweidimensionalen Array geschrieben und als Intensitätshistogramme dargestellt. In den 2D-Intensitätshistogrammen stellt die Zahl der Bins mit gleichzeitig hohen Werten für beide Farbkanäle ein Maß für die Zahl und Konzentration der spezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden markierten Zielmoleküle dar. Der Gebrauch von zwei unabhängig fluoreszierenden Proben erlaubt die Analyse der molekularen Zusammensetzung der Zielpartikel. Da die einzelnen Aggregate das Detektionsvolumen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchqueren, können Proben, bestehend aus einer Mischung von verschiedenen Aggregattypen, in Bezug auf die Anzahl und die relative Menge dieser Aggregate analysiert werden.

Zusätzlich zur Sensitivität eröffnet das zwei Farben SIFT hier eine besondere Möglichkeit, Koaggregationsprozesse zu untersuchen. Wie oben erwähnt, passieren die einzelnen Aggregate das Detektionsvolumen zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierdurch kann mittels der zweifarbigen Messung die Markierungsrate von zwei unterschiedlich markierten Proben für jedes Aggregat getrennt bestimmt werden. Sogar die molekulare Zusammensetzung von Aggregaten in Ansätzen, die eine Mischung von verschiedenen Typen von Aggregaten aufweisen, können auf diese Weise beobachtet werden.

FIDA und 2D-FIDA Auswertung

Die FIDA Auswertung wurde als zusätzliche Analysemethode verwendet, um die mit dem SIFT Verfahren gewonnenen Daten zu analysieren, da diese mit einem mobilen Fokus gewonnen wurden und somit diffusionsbasierte Auswerteverfahren, wie z. B. die Autokorrelation, nicht sinnvoll angewendet werden können. Die Basis der FIDA Auswertung ist die statistische Analyse von Photonenzahlen. Hier wird die spezifische Helligkeit einzelner fluoreszierender Moleküle in Proben mit heterogenen Helligkeitsprofilen detektiert [51, 118, 119]. Es wurde dafür die *FCSP Evaluation Software Version 2.0* (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland) verwendet. Das Fluoreszenzsignal wird zyklisch alle $40\ \mu\text{s}$ aufgezeichnet (vgl. Abschnitt 2.11.3). Die pro Zeitintervall detektierten Photonen und ihre Häufigkeit können mittels eines Intensitätsverteilungshistogramms dargestellt und mit Hilfe eines FIDA-Multikomponenten-Fits statistisch ausgewertet werden.

Die 2D-FIDA Auswertung ist der FIDA Auswertung sehr verwandt. Sie hat den Vorteil, die Daten aus dem roten und aus dem grünen Kanal gleichzeitig detektieren und auswerten zu können. Dadurch können die Informationen beider Detektionskanäle verglichen werden und liefern somit Daten über die spezifische Helligkeit von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten, diffundierenden Molekülen. Auch bei der 2D-FIDA Auswertung werden die Daten in Zeitfenstern von ca. $40\ \mu\text{s}$ (Bins) gesammelt und die dabei aufgezeichneten Photonenzahlen aus beiden Detektoren statistisch ausgewertet. Die so gewonnenen

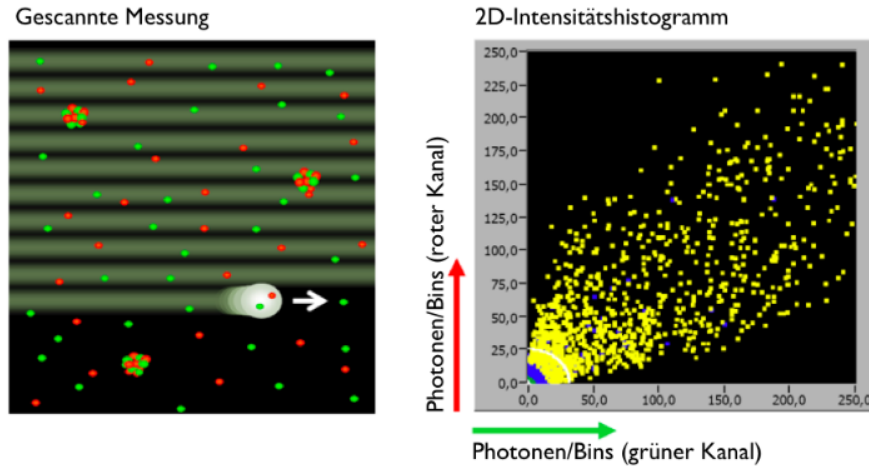


Abb. 2.4: Schematische Darstellung einer Messung, deren zu erfassendes Probedvolumen durch einen mobilen Lasermessfokus vergrößert wird und die Darstellung der so gewonnenen Daten in einem 2D-Intensitätshistogramm. Hier wird die Anzahl an gezählten Photonen pro Bins im roten (y-Achse, max. 250 Photonen) und grünen Kanal (x-Achse, max. 250 Photonen) nach ihrer Intensität auf der jeweiligen Achse, nach ihrer Häufigkeit farbcodiert, dargestellt. Die Bins mit hohen Werten für beide Kanäle repräsentieren zweifarbige, also sowohl Alexa488 als auch Alexa647 markierte Proteinaggregate (modifiziert nach [73]).

Daten können zur Verbesserung der Anschaulichkeit als 2D-Intensitätshistogramme dargestellt werden. Die x- und y-Achse zeigen die gezählten Photonen der beiden Detektoren pro Bins an, also die Intensität des grünen (x-Achse) oder des roten Fluoreszenzsignals (y-Achse). Die z-Achse, die durch verschiedene Farben dargestellt ist, beschreibt die Häufigkeit gleichartiger Ereignisse, d. h. die Zahl der Bins eines Intensitätspaares ist durch die Farbe des jeweiligen Punktes logarithmisch dargestellt. Mit dieser Darstellungstechnik können so genannte „Punktwolken“ generiert werden, die einen guten visuellen Eindruck von Aggregationsprozessen und von der Qualität einer Messung vermitteln (Abb. 2.4) [51, 118, 119].

SIFT Auswertung

Eine weitere Möglichkeit, 2D-Intensitätshistogramme auszuwerten, erfolgt durch die hochsensitive SIFT Auswertung mit Hilfe des *2D-SIFT Softwaremoduls* (Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland). Im Rahmen dieses Verfahrens wird in einem ersten Schritt eine Schwelle festgelegt. Dies erfolgt anhand von Parallelproben, die nicht aggregiertes Protein enthalten. Die Schwelle kann von der Software auch automatisch generiert werden. Dieser gewählte Bereich befindet sich in der linken unteren Ecke der Intensitätshistogramme (vgl. Abb. 2.5) und wird im weiteren Verfahren als separater Sektor betrachtet. Im Folgenden wird der verbleibende Anteil des 2D-Intensitätshistogrammes

in gleich große Segmente unterteilt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden typischerweise 18 Segmente gewählt (vgl. Abb. 2.5). Mit Hilfe der Software können die im Segment abgebildeten Punkte aufsummiert werden. Es kann jedoch ebenfalls eine photonengewichtete oder distanzgewichtete Summe berechnet werden. Hierbei wird beachtet, dass Punkte, die weiter peripher in einem Segment liegen, mehr Photonen repräsentieren. In beiden Kanälen ist die im Rahmen der Intensitätshistogramme größte erfassbare Photonenanzahl pro Bins mit 255 Photonen pro 40 μs gleich. Anhand ihrer Fluoreszenzcharakteristik wird die Häufigkeit der identifizierten Teilchenspezies ermittelt, wobei die Anzahl hochintensiver Bins als ein direktes Maß für die Anzahl und Konzentration großer Aggregate angesehen werden kann.

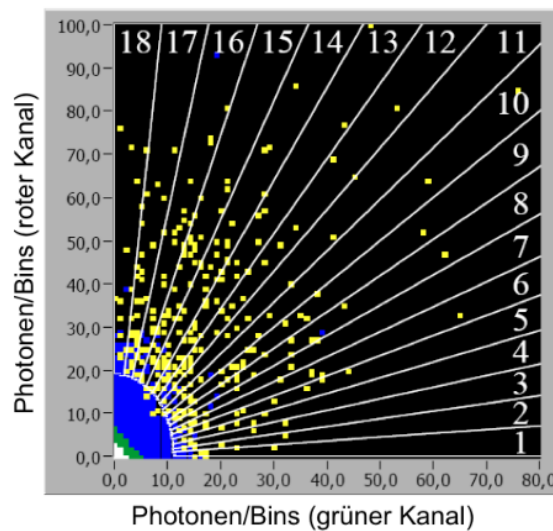


Abb. 2.5: SIFT Auswertung eines 2D-Intensitätshistogramms. Die Fläche wird in 18 Segmente unterteilt, wobei ein 19. Segment einer definierten Größe im linken unteren Abschnitt des Histogramms die dunkelsten Partikel aus nicht aggregiertem Protein abgrenzt. In diesem Beispiel zeigt die y-Achse die Zahl der Photonen pro Bins für den roten Kanal bis zu einem Maximalwert von 100 Photonen und die x-Achse die Photonen pro Bins für den grünen Kanal bis zu einem Wert von 80 Photonen. Die Punkte stellen die einzelnen Bins entsprechend ihrer Helligkeit und Farbverteilung auf den Achsen und nach Häufigkeit farbcodiert dar. Hierbei entsprechen Segment 1 - 3 den grün fluoreszierenden Aggregaten, Segment 16 - 18 den rot fluoreszierenden Proteinaggregaten und die Segmente 4 - 15 stehen für die zweifarbig markierten Koaggregate (modifiziert nach [141]).

FRET Analyse

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) wurde bereits 1946 von Theodor Förster entdeckt [56]. Bei diesem physikalischen Prozess wird die Energie eines angeregten fluoreszierenden Farbstoffs (Donor-Fluorophor) ohne Strahlung auf einen zweiten

fluoreszierenden Akzeptor (Akzeptor-Fluorophor) übertragen. Der FRET kann über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz detektiert werden. Es gibt verschiedene Kriterien, die erfüllt sein müssen, um eine strahlungsfreie Energieübertragung zu gewährleisten. Hierzu zählen das Spektrum, die Schwingungsebene und der Abstand. Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Im Weiteren müssen Donor und Akzeptor parallele elektronische Schwingungsebenen aufweisen. Die Intensität des FRET hängt im Weiteren vom Abstand der beiden Fluorophore zueinander ab. Dies führt dazu, dass der FRET auch als optisches Nanometermaß verwendet werden kann. Da die Intensität des FRET-Signals mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore abnimmt, sollten Donor und Akzeptor nur wenige Nanometer voneinander entfernt sein. Genau diese Eigenschaft wird in dieser Dissertation eingesetzt. Es wird davon ausgegangen, dass ein FRET-Signal nur dann detektiert werden kann, wenn die fluoreszierenden Moleküle nur wenige Nanometer voneinander entfernt innerhalb eines Aggregates liegen. Somit kann durch den FRET eine Vorstellung vom Aufbau von Oligomeren gewonnen werden (vgl. Abschnitt 4.5.1).

In dieser Versuchsreihe kamen in zwei Farben markierte Tau-Proteine, Alexa488 und Alexa647, zur Anwendung. Die in diesen Versuchen verwendeten Proteine wurden in einer ersten Messung sowohl mit dem roten als auch mit dem grünen Laser angeregt, wodurch rote und grüne Fluoreszenz emittierte. In einer zweiten Messung, der so genannten "FRET-Messung", kam der gleiche Versuchsansatz jedoch lediglich mit dem grünen Laser (488 nm) zur Anwendung. Konnten nun in der FRET-Messung zweifarbig Aggregate, also rot und grün fluoreszierende Moleküle, detektiert werden, so konnte davon ausgegangen werden, dass eine Übertragung der Fluoreszenz von den grün fluoreszierenden auf die roten Fluoreszenzfarbstoffe, also ein Energietransfer stattfand. Ein Energietransfer wurde nicht gemessen, wenn nur einfach markierte Proteine, also entweder Donor-Fluorophore oder Akzeptor-Fluorophore, untersucht wurden [14] (vgl. Abschnitt 4.5.1 und Abb. 4.1).

3 Ergebnisse

3.1 Proteinexpression

Um auf molekularer Ebene die Aggregationsprozesse von Tau-Protein beobachten und analysieren zu können, war es erforderlich, ausreichende Mengen an Tau-Protein zu exprimieren (vgl. Abschnitt 2.3) und dessen Konzentration zu ermitteln (vgl. Abschnitt 2.5). Hierfür standen unterschiedliche Verfahren zu Verfügung. In dieser Arbeit wurden der Bradford-Assay (vgl. Abschnitt 2.5.2), der Bicinchoninsäure-Assay (vgl. Abschnitt 2.5.1) und eine Proteinbestimmung mit Hilfe eines Coomassie-Gels (vgl. Abschnitt 2.4 und Abschnitt 2.5.3) durchgeführt. Mit diesen Verfahren konnte für die Stammlösung des exprimierten Tau-Proteins eine Konzentration von 2 mg/ml ermittelt werden.

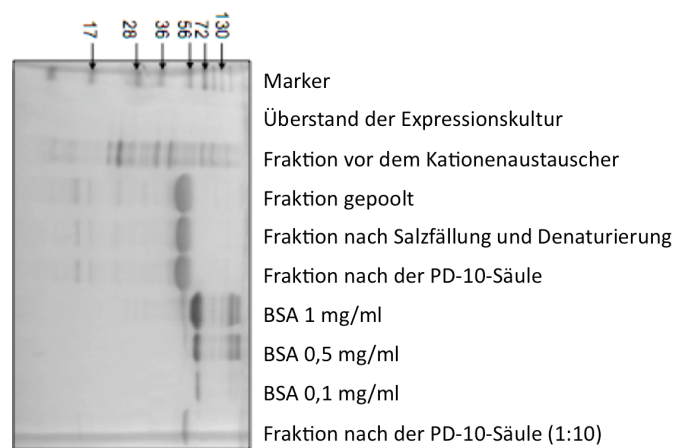


Abb. 3.1: Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE Gel, digitalisiert (ChemiGenius, Bio Imaging System). Gezeigt sind die Reinigungsschritte der Proteinexpression des Tau-Proteins (Kationenaustauscher, Salzfällung und Denaturierung, PD-10-Säule) und eine BSA-Konzentrationsreihe für die Proteinbestimmung der Tau-Stammlösung.

Das so gewonnene Tau-Protein wurde für einzelmolekülspektroskopische Verfahren verwendbar gemacht, indem es mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde. Hierbei handelte es sich um die für die Einzelmolekülspektroskopie geeigneten und gängigen Fluorophoren Alexa488 und Alexa647 (vgl. Abschnitt 2.6.1). Für die Proteinmarkierung wurde in früheren Dissertationen am ZNP ein effektives Markierungsprotokoll erstellt, das in dieser Arbeit verwendet wurde (vgl. [10, 98, 140] und Abschnitt 2.6).

3.2 *De novo* Aggregationsansatz für Tau-Protein und α -Synuklein

3.2.1 Aggregationsverhalten von Tau-Protein

Mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wurden *in vitro* unterschiedliche Milieubedingungen geschaffen, innerhalb derer das Aggregationsverhalten von Tau-Protein näher charakterisiert werden konnte. So zeigten Tau-Proteine unter Tris-Puffer-Bedingungen eine geringe Bildung von Aggregaten. Diese Ereignisse emittierten nur wenige Photonen pro Bins, d. h. die Intensität ihres Fluoreszenzsignals war gering, wie auch die Häufigkeit der Ereignisse (Abb. 3.2-A). NP40 hatte einen tendenziell fördernden Einfluss auf die Bildung von Tau-Protein-Aggregaten (Abb. 3.2-B). Wurden das Lösungsmittel DMSO oder der Alkohol Ethanol der Tau-Protein-Stammlösung zugefügt und analysiert, dann konnte ebenfalls ein aggregationsfördernder Effekt dieser auf Tau-Proteine verzeichnet werden. Die entstandenen Aggregate zeigten eine höhere Intensität des Fluoreszenzsignals in beiden Kanälen, verglichen mit den Punktwolken, die unter Puffer-Bedingungen entstanden waren. Dabei wurden in Gegenwart von Ethanol noch hellere Aggregate gebildet als durch DMSO (Abb. 3.2-C, -D).

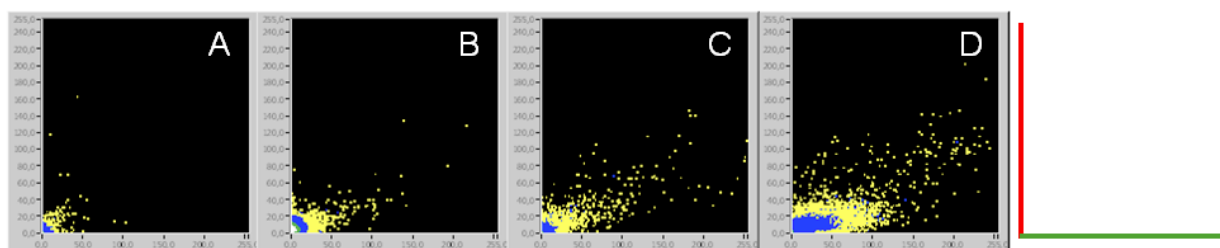


Abb. 3.2: Das Aggregationsverhalten von Tau-Protein (Alexa488-, Alexa647-markiert). 2D-Intensitätshistogramme visualisieren das Verhalten von Tau-Protein unter verschiedenen Milieubedingungen: Tris-Puffer 50 mM (A), Tris-Puffer und NP40 0,1 % (B), DMSO 1 % (C) oder Ethanol 10 % (D). Die Partikelzahl der Tau-Proteine lag in beiden Kanälen bei ca. 5. Der Maßstabsbalken beschreibt jeweils 255 Photonen pro Bins auf der x- und y-Achse.

3.2.2 Aggregationsverhalten von α -Synuklein

Im Vorfeld wurde das Aggregationsverhalten von α -Synuklein innerhalb unterschiedlicher Milieubedingungen analysiert, um die Prozesse, die eine Koaggregation zwischen α -Synuklein und Tau-Protein *in vitro* ermöglichen, effektiv untersuchen zu können. So zeigte das Protein α -Synuklein unter Tris-Puffer-Bedingungen eine nur minimale Bildung von Aggregaten. Verglichen mit dem Aggregationsverhalten von Tau-Protein (vgl. Abb.

3.2-A) zeigten sich unter identischen Bedingungen bezüglich Häufigkeit und Fluoreszenzintensität deutlich weniger Aggregate (Abb. 3.3-A). Ein mit Tau-Protein verglichen unterschiedliches Verhalten zeigte sich auch in Anwesenheit des Tensids NP40. Hier wurde die Adhäsion von α -Synuklein an der Messplattenoberfläche nahezu vollständig inhibiert, d. h. das Protein wurde fast vollständig in Lösung gehalten. Demzufolge zeigte das 2D-Intensitätshistogramm einen hohen Anstieg der Häufigkeit der ungebundenen markierten Sondenmoleküle. Eine wie bei Tau-Protein im Vergleich zu Puffer-Bedingungen gefördertes Aggregationsverhalten unter NP40 fand nicht statt (Abb. 3.3-B). Das Lösungsmittel DMSO und der Alkohol Ethanol zeigten entsprechend ihrer Wirkung auf Tau-Protein (vgl. Abb. 3.2-C, -D) einen aggregationsfördernden Effekt auf α -Synuklein. Die hier zahlreich entstandenen Aggregate wiesen eine hohe Intensität des Fluoreszenzsignals in beiden Kanälen auf, wobei Ethanol wieder zu helleren und zahlenmäßig häufigeren Aggregaten führte als DMSO (Abb. 3.3-C, -D).

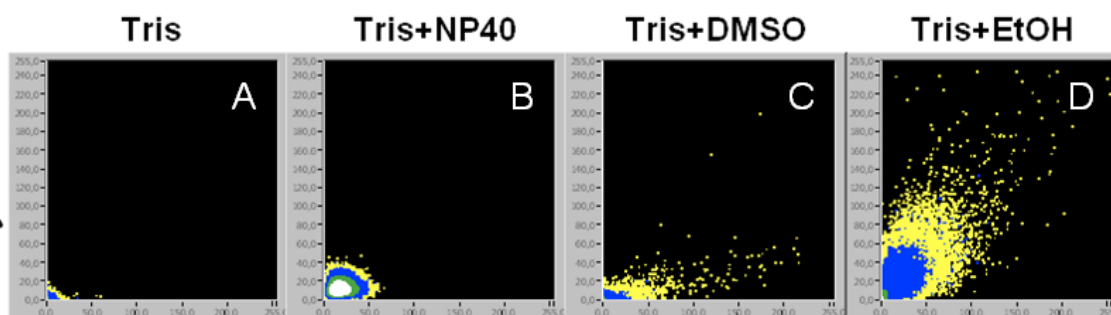


Abb. 3.3: Aggregationsverhalten von α -Synuklein (Alexa488-, Alexa647-markiert). 2D-Intensitätshistogramme visualisieren das Verhalten von α -Synuklein unter verschiedenen Milieubedingungen: Tris-Puffer 50 mM (A), Tris-Puffer und NP40 0,1 % (B), DMSO 1 % (C) oder Ethanol 10 % (D). Die Partikelzahl der α -Synukleine lag in beiden Kanälen bei ca. 18. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

3.2.3 Aggregationsanalyse von Tau-Protein in Anwesenheit von Metallionen

An dieser Stelle wurden die Effekte unterschiedlicher Metallionen auf das Aggregationsverhalten von Tau-Proteinen mittels einzelmolekülspektroskopischer Verfahren untersucht. Die Wirkung der dreiwertigen Metallionen Aluminium (Al^{3+}) und Eisen (Fe^{3+}) sowie die der zweiwertigen Ionen Kalzium (Ca^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}), Mangan (Mn^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) wurde näher charakterisiert.

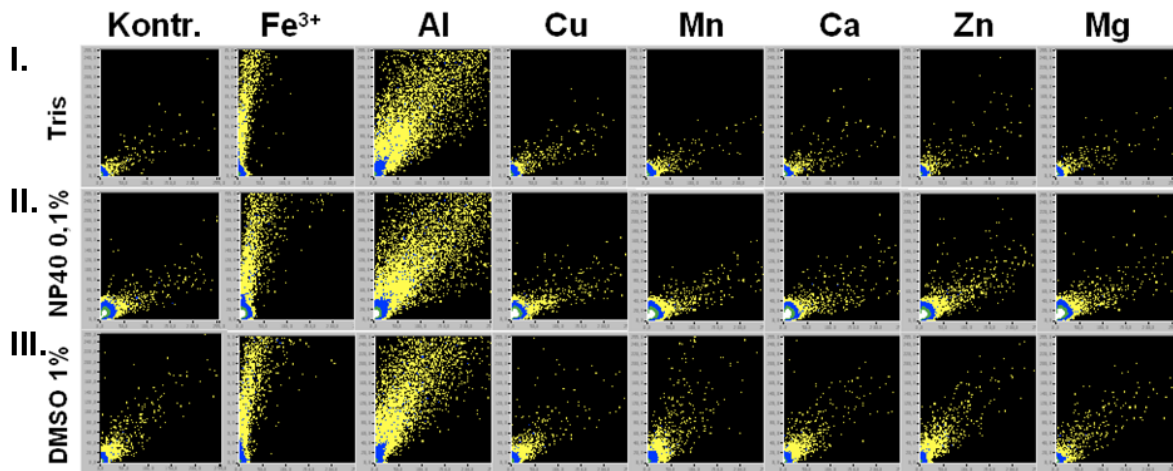


Abb. 3.4: Verhalten von Tau-Protein (Alexa488- und Alexa647-markiert) in Anwesenheit von Metallionen: Untersuchung von Fe^{3+} -, Al^{3+} -, Cu^{2+} -, Mn^{2+} -, Ca^{2+} -, Zn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen ($10 \mu\text{M}$) unter verschiedenen Milieubedingungen: Tris-Puffer 50 mM (I.) und Tris-Puffer mit NP40 0,1 % (II.) oder DMSO 1 % (III.). Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Dieser Versuch zeigte, dass innerhalb unterschiedlicher Milieubedingungen (Tris-Puffer, Tris-Puffer und NP40 oder DMSO) sowohl Eisen- als auch Aluminiumionen einen aggregationsfördernden Effekt auf Tau-Proteine aufwiesen. Eine Bildung von zahlreichen zweifarbig fluoreszierenden Aggregaten mit hoher Fluoreszenzintensität wurde detektiert, also Ereignisse, die viele Photonen pro Bins in beiden Kanälen gleichzeitig emittierten. Für die anderen Metallionen (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) konnte unter diesen Versuchsbedingungen keine effektive Förderung der Aggregation von Tau-Proteinen verzeichnet werden. Die 2D-Intensitätshistogramme zeigten hier der Kontrolle entsprechende Punktwolken (Abb. 3.4).

Um herauszufinden, ab welcher Konzentration Aluminium- oder Eisenionen wirken, wurde den obigen Versuchen jeweils Verdünnungsreihen angeschlossen.

Verdünnungsreihe für Aluminiumionen

Ein aggregationsfördernder Effekt der Aluminiumionen auf Tau-Protein konnte in den 2D-Intensitätshistogrammen ab einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ detektiert werden. Mit steigender Konzentration von Aluminium zeigte sich eine Zunahme von Ereignissen, die zahlreiche Photonen pro Bins gleichzeitig im roten und grünen Kanal emittierten. Von $0,003 \mu\text{M}$ bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Aluminium zeigten die Punktwolken ein der Kontrolle (Tau-Protein in Tris-Puffer) nahezu entsprechendes Aussehen (Abb. 3.5).

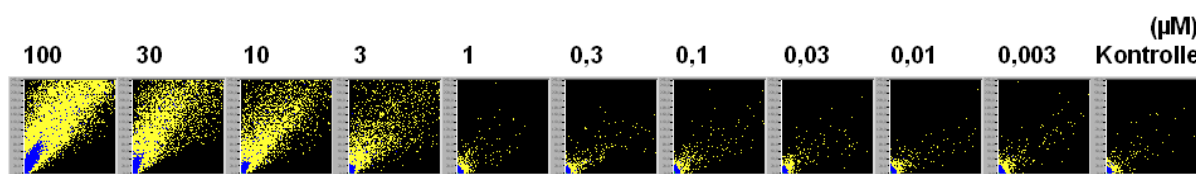


Abb. 3.5: Wirkung von Aluminiumionen (Al^{3+}) auf Tau-Protein (Alexa488- bzw. Alexa647-markiert). Konzentrationsreihe der Aluminiumionen von 0,003 - 100 μM in Tris-Puffer 50 mM. Die Partikelzahl der Tau-Proteine in beiden Kanälen lag bei ca. 5. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Im Folgenden wurde der Effekt von Aluminiumionen mittels einer SIFT Auswertung quantitativ analysiert und in einem Graphen aufgetragen. Ab 3 μM Aluminium war ein deutlicher Anstieg des SIFT-Signals zu verzeichnen (Abb. 3.6).

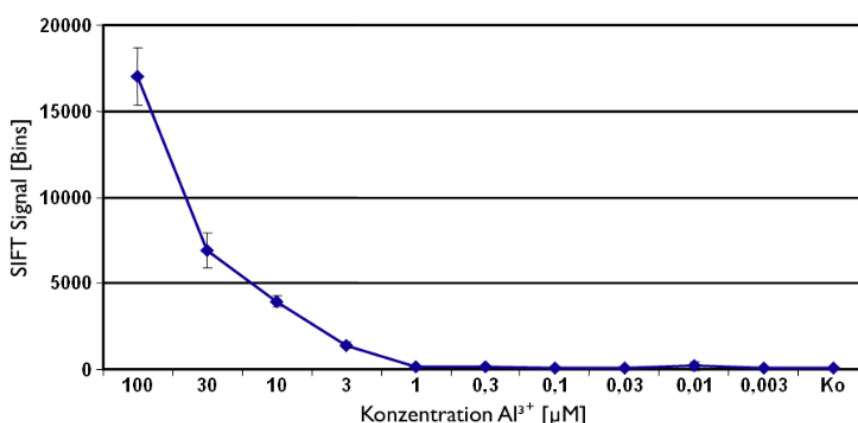


Abb. 3.6: Aluminiumionen-Verdünnungsreihe in Tris-Puffer (50 mM). SIFT-Auswertung: Zusammenfassung der Segmente 1 - 6 von 6 aus sechs Einzelmessungen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung eines 4-fach Ansatzes. Ko bezeichnet die Kontrolle.

Verdünnungsreihe für Eisenionen

Eisenionen wiesen einen aggregationsfördernden Effekt auf Tau-Proteine auf. In den 2D-Intensitätshistogrammen konnte eine effiziente Zunahme von Aggregaten ab einer Konzentration von 1 μM gezeigt werden, wobei mit steigender Konzentration die Anzahl und Helligkeit der Ereignisse zunahm. Von 0,003 μM bis zu einer Konzentration von 0,3 μM zeigten die Punktwolken ein der Kontrolle (Tau-Protein in Tris-Puffer) nahezu entsprechendes Aussehen (Abb. 3.7).

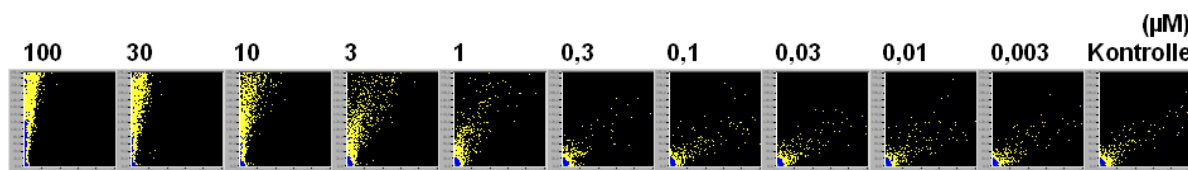


Abb. 3.7: Wirkung von Eisenionen (Fe^{3+}) auf Tau-Protein (Alexa488- bzw. Alexa647-markiert). Konzentrationsreihe der Eisenionen (0,003 - 100 μM) in Tris-Puffer 50 mM. Die Partikelzahl der Tau-Proteine lag in beiden Kanälen bei ca. 5. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Im Folgenden wurde eine quantitative SIFT Auswertung der Ergebnisse durchgeführt. Es zeigte sich, dass ab 1 μM Eisenionen ein deutlicher Anstieg des SIFT-Signals zu detektieren war (Abb. 3.8).

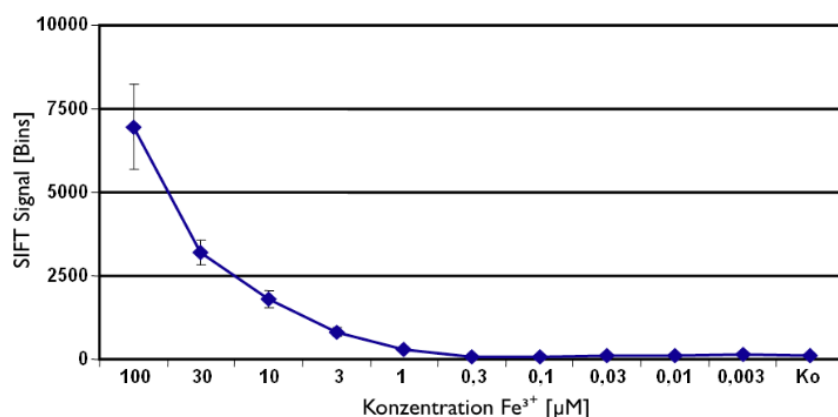


Abb. 3.8: Die Eisenionen-Verdünnungsreihe in Tris-Puffer (50 mM). SIFT Auswertung: Zusammenfassung der Segmente 1 - 6 von 6 aus sechs Einzelmessungen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung eines 4-fach Ansatzes. Ko bezeichnet die Kontrolle.

Die Verdünnungsreihen wurden zusätzlich in Gegenwart von NP40 und DMSO untersucht (nicht gezeigt). Es wurde kein zusätzlicher Effekt auf die Metallionen induzierte Aggregation festgestellt. Vielmehr führten Aluminiumionen auch in Gegenwart dieser beiden Substanzen konstant ab 3 μM zu einer gegenüber der Kontrolle geförderten Aggregation von Tau-Protein. Eisenionen zeigten ihre aggregationsfördernde Wirkung ebenfalls konstant ab 1 μM , unabhängig von der Anwesenheit von DMSO oder NP40.

3.2.4 Untersuchung der Dynamik oligomerer Tau-Protein-Aggregate

Für diese Versuchsreihe wurden rot markierte Tau-Proteine (Alexa647) und grün markierte Tau-Proteine (Alexa488) verwendet. Diese Tau-Proteine wurden jeweils mit DMSO 1 % in Tris-Puffer 50 mM für 1,5 Stunden separat vorinkubiert, um die Aggregation von Tau-Monomeren zu oligomeren Tau-Intermediaten zu induzieren. Die hierbei entstandenen Aggregate, im Folgenden „präformierte“ Aggregate genannt, wurden mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie auf ihre Stabilität geprüft.

Messung des Ausgangswertes

Um den Ausgangswert zu bestimmen, wurden die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proteine nach der Vorinkubation, sowohl nach Markierung getrennt, als auch innerhalb eines akut gemischten Ansatzes untersucht. Wie erwartet, zeigte Alexa647 markiertes Tau-Protein Aggregate im roten Kanal (Abb. 3.9-A). Analog waren für Alexa488 markiertes Tau-Protein Aggregate im grünen Kanal zu detektieren (Abb. 3.9-C).

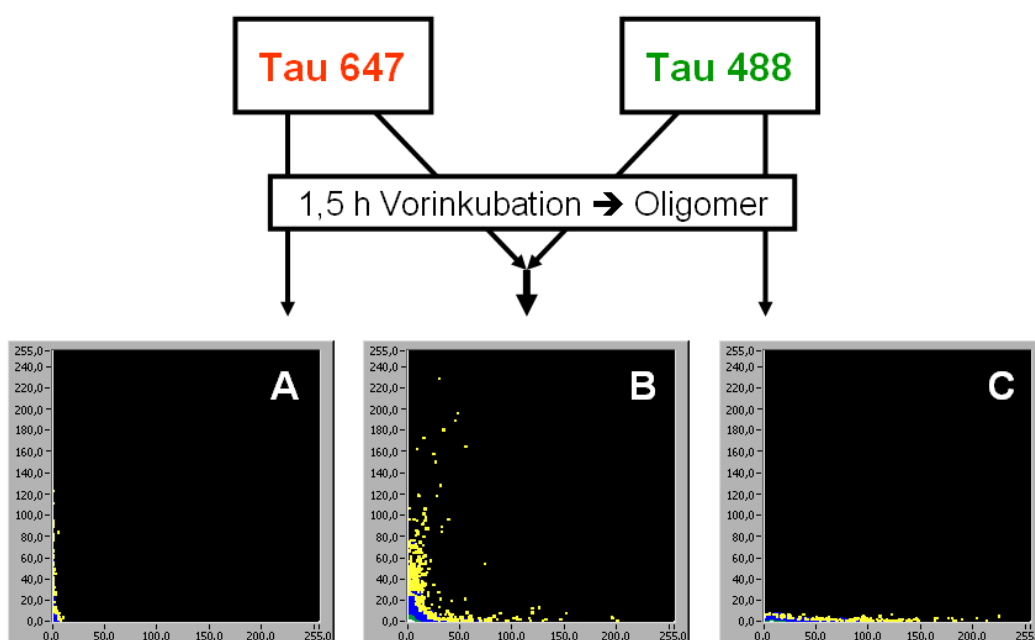


Abb. 3.9: Oligomer Dynamik – Messung des Ausgangswertes. Tau-Proteine wurden jeweils 1,5 Stunden mit DMSO vorinkubiert, um eine Oligomerbildung zu induzieren. Tau-Protein wurde in A) Alexa647 markiert verwendet, in C) Alexa488 markiert und in B) die Ansätze A und B nach separater Vorinkubation gemischt und dann sofort auf die Messplatte aufgetragen. Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

In dem Ansatz, in dem die unterschiedlich markierten Tau-Proteine nach separater Vorinkubation gemeinsam untersucht wurden, konnten hellere Aggregate vor allem im roten oder im grünen Kanal detektiert werden. Aggregate, die gleichzeitig sowohl rote als auch grüne Fluoreszenz emittierten, waren kaum detektierbar. Es konnte keine neue Bildung von zweifarbigem Aggregaten aus den unterschiedlich markierten Tau-Proteinen gezeigt werden (Abb. 3.9-B).

Messung über die Zeit

Wurden die präformierten, mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Tau-Protein-Aggregate über einen Zeitraum von 240 Minuten weiter inkubiert und analysiert (vgl. Abschnitt 2.11.1), so wurden, analog zur „Messung des Ausgangswertes“ (vgl. Abschnitt 3.2.4), vor allem im roten oder im grünen Kanal Aggregate detektiert (Abb. 3.10-Tau 488+647). Mit Hilfe einer SIFT Analyse konnte, in Abhängigkeit von der Zeit, zwischen einfarbigen und zweifarbigem Oligomeren unterschieden werden. In obiger Versuchsreihe war der Anteil von zweifarbigem Aggregaten an den Gesamtaggregate bei circa 25 % über einen Zeitraum von 240 Minuten konstant. Dies spricht für die Stabilität der präformierten einfarbigen Oligomere (vgl. Abb. 3.12).

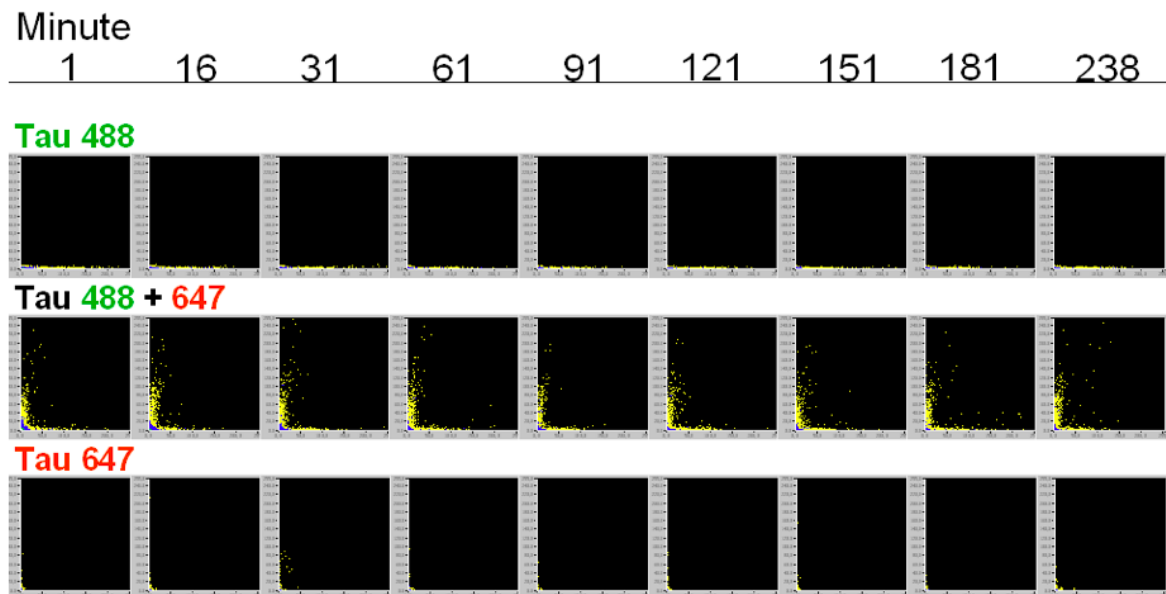


Abb. 3.10: Oligomer Dynamik – Messung über die Zeit. Beobachtung des Verhaltens präformierter Tau-Aggregate über einen Zeitraum von 240 Minuten. Die Partikelzahl betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Oligomer Dynamik nach Zugabe von NP40 und Aluminiumionen

Im Anschluss an die erste Messung wurde den Versuchsansätzen entweder das Tensid NP40 oder Aluminiumionen (Al^{3+}) zugefügt und erneut über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen. Die aggregationsfördernde Wirkung von NP40 und Aluminiumionen auf Tau-Protein kann an entsprechender Stelle nachgelesen werden (vgl. 3.2.1 und 3.2.3).

Ab Beginn der neuen Messung zeigten die 2D-Intensitätshistogramme zweifarbig fluoreszierende Aggregate, die in ausgeglichenem Verhältnis sowohl rot als auch grün fluoreszierend markierte Tau-Proteine enthielten. Das Zufügen der Substanzen schien die Tau-Proteine der präformierten Aggregate neu zu ordnen.

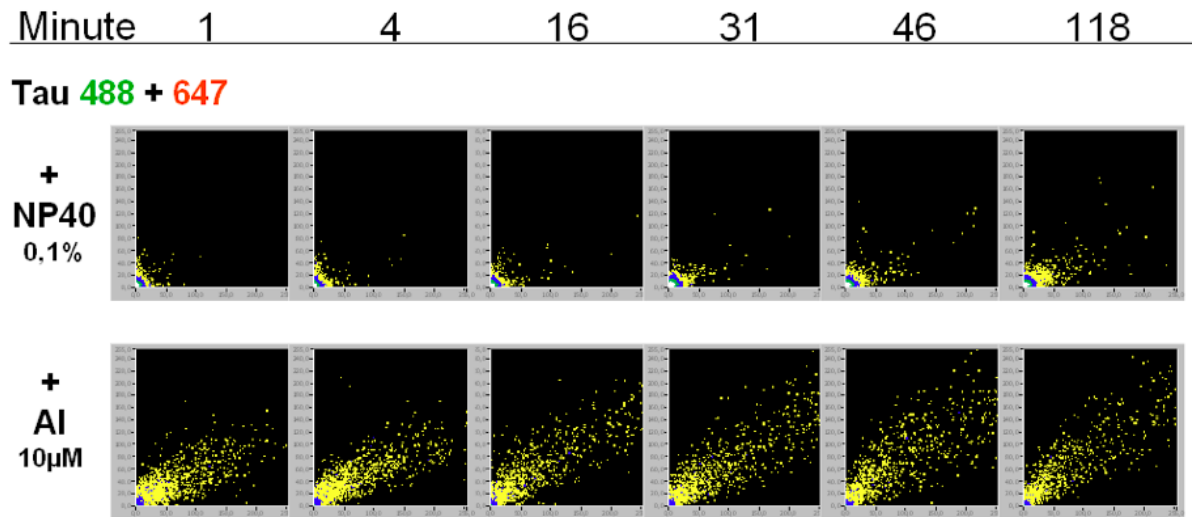


Abb. 3.11: Oligomer Dynamik nach Zugabe von NP40 und Aluminiumionen. Beobachtung des Verhaltens präexistenter Tau-Aggregate über einen Zeitraum von 120 Minuten (im Anschluss an die 240 Minuten Messung) in Gegenwart von NP40 0,1 % oder Aluminium 10 μM . Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

In Anwesenheit von NP40 oder Aluminium entstanden jedoch unterschiedliche Punktwolken. NP40 erhöhte den Anteil monomerer Sondenmoleküle (vgl. 3.2.1) und führte zu einer Bildung von zunächst wenig hellen zweifarbig fluoreszierenden Aggregaten, deren Fluoreszenzintensität für beide Kanäle über die Zeit zunahm (vgl. Abb 3.11-+NP40 und Abb. 3.13). In der SIFT Analyse konnte ein langsamer, aber konstanter Anstieg der zweifarbig fluoreszierenden Aggregate über den Messzeitraum von 2 Stunden verzeichnet werden. Für die zweifarbig Aggregatbildung stellte sich nach 30 - 60 Minuten ein Gleichgewicht bei ca. 60 - 70 % zweifarbigem Oligomere an den Gesamtoligomeren ein

(vgl. Abb. 3.12). In einem zweikomponenten FIDA Fit war die durchschnittliche Größe der in Gegenwart von NP40 gebildeten Oligomere kleiner (34 Monomere pro Oligomer) als die der durch DMSO gebildeten Oligomere (63 Monomere pro Oligomer) (vgl. Abb. 3.13).

Aluminiumionen zeigten eine andere Wirkung. Direkt nach Zugabe von Aluminiumionen bildeten sich sehr schnell helle zweifarbig fluoreszierende Aggregate (vgl. 3.11-+Al und Abb. 3.13). Die SIFT Analyse zeigte, dass nahezu 100 % der Aggregate zweifarbig Oligomere wurden (vgl. Abb. 3.12). Zudem erreichten diese Aggregate mehr als die vierfache Helligkeit der durch DMSO induzierten Aggregate, wobei ihre Durchschnittsgröße bei 370 Monomeren pro Oligomer lag (vgl. Abb. 3.13). Dies deutet auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der zwei Substanzen auf das Aggregationsverhalten von Tau-Protein hin (vgl. Abschnitt 4.4).

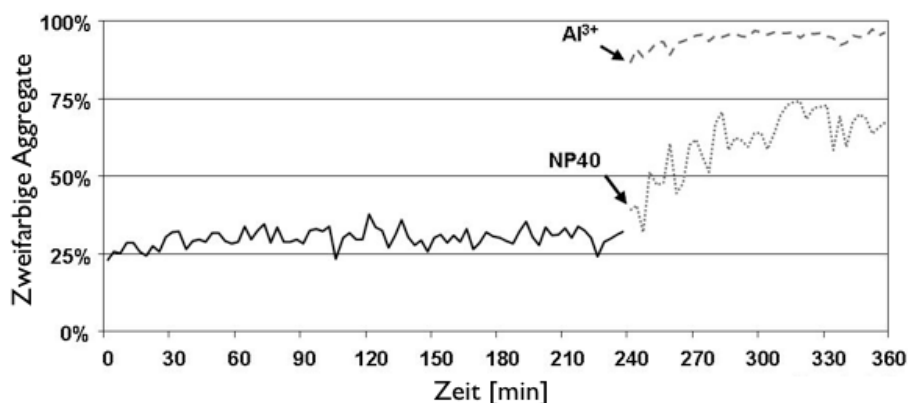


Abb. 3.12: Darstellung der Bildung von zweifarbigem Aggregaten über die Zeit. Der Anteil von zweifarbigem Aggregaten an den Gesamtaggregate war bei ca. 25 % über einen Zeitraum von 240 Minuten konstant (erste Messung). Nach Zugabe von NP40 0,1 % stellte sich nach 30 - 60 Minuten ein Gleichgewicht bei ca. 60 - 70 % zweifarbigem Oligomere an den Gesamtaggregate ein, während Aluminiumionen 10 μ M dazu führten, dass nahezu 100 % der Aggregate zweifarbig Oligomere wurden (zweite Messung über 2 Stunden).

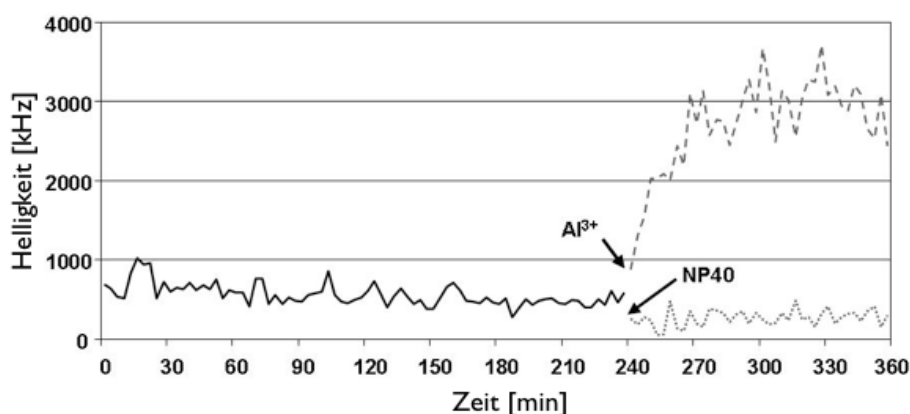


Abb. 3.13: Darstellung der Partikelhelligkeit über die Zeit. Die Größe der präformierten (DMSO) Aggregate war in einem zweikomponenten FIDA Fit bei durchschnittlich 63 Monomeren pro Oligomer stabil. Aggregate, die sich nach Zugabe von NP40 0,1 % bildeten, waren mit durchschnittlich 34 Monomeren pro Oligomer kleiner, während durch Aluminium 10 μ M induzierte Aggregate mehr als die vierfache Helligkeit der durch DMSO gebildeten Aggregate erreichten und eine Durchschnittsgröße von ca. 370 Monomeren pro Oligomer aufzeigten.

3.2.5 Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein

Tau-Protein und α -Synuklein wurden jeweils sowohl Alexa488 als auch Alexa647 markiert verwendet, unter verschiedenen Milieubedingungen analysiert und miteinander, wie in Abb. 3.14 gezeigt, kombiniert.

	Tau-Protein	Synuklein
1.	647+488	
2.		647+488
3.	647	488
4.	488	647

Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Kombinationsmöglichkeiten des Alexa488- bzw. Alexa647-markierten α -Synuklein und Tau-Protein.

Das Aggregationsverhalten von Tau-Protein wurde ausführlich in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Zusätzlich wurde hier die Wirkung von DMSO mit NP40 und Ethanol mit NP40 analysiert. Die Aggregation von Tau-Protein wurde innerhalb der unterschiedlichen Milieubedingungen effizient gefördert (Abb. 3.15-I).

Auf das Aggregationsverhalten von α -Synuklein geht Abschnitt 3.2.2 ausführlich ein. Wurde dem α -Synuklein-Ansatz zusätzlich zu NP40 noch DMSO oder Ethanol beigegeben, so war im untersuchten Konzentrationsbereich die antiaggregatorische Wirkung von NP40 stärker (Abb. 3.15-II).

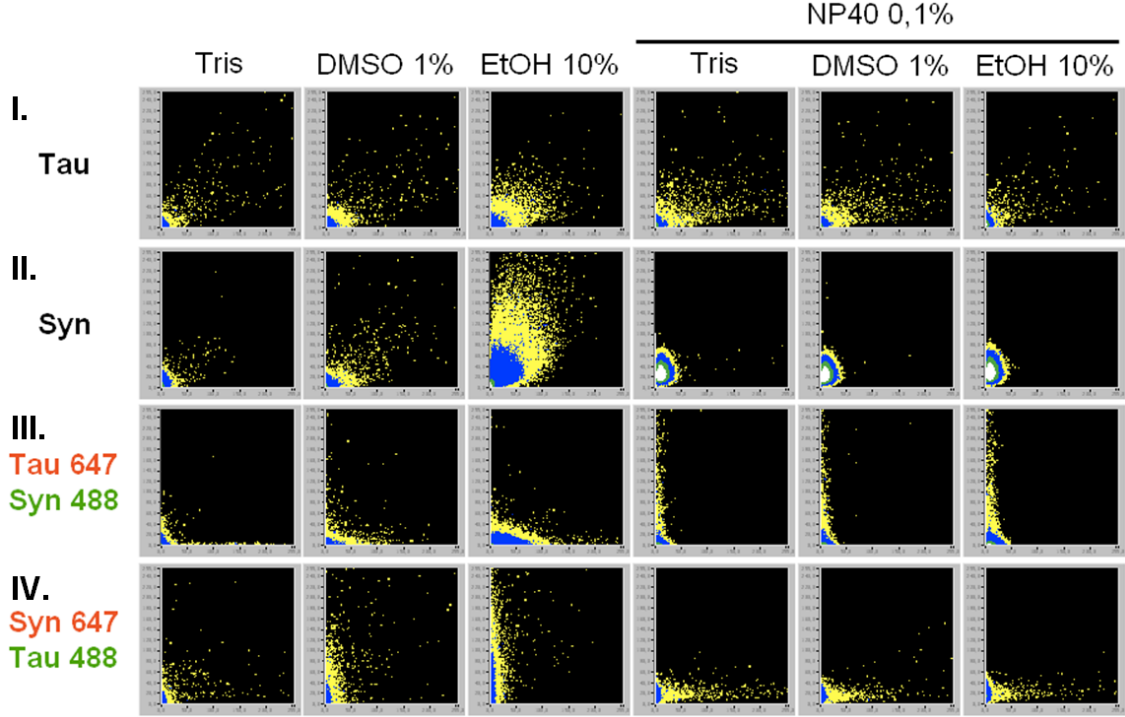


Abb. 3.15: Koaggregationsversuch von Tau-Protein und α -Synuklein. Die 2D-Intensitätshistogramme repräsentieren das Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % oder Ethanol 10 % und jeweils parallele Ansätze unter Zugabe von NP40 0,1 %. Die Partikelzahl der Tau-Proteine in beiden Kanälen betrug ca. 4. Die Partikelzahl der α -Synukleine betrug in beiden Kanälen ca. 35. Im Koaggregationsansatz war das Verhältnis der Partikelzahl von Tau-Protein und α -Synuklein ca. 1 zu 10. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Wurden α -Synuklein und Tau-Protein unterschiedlich mit Fluorophoren markiert und unter Tris-Puffer-Bedingungen gemeinsam untersucht, wurden zweifarbige Aggregate detektiert, also Koaggregate, deren Werte für die Photonen pro Bins in beiden Kanälen ähnlich hoch waren. Ein großer Anteil der gebildeten Aggregate zeigte jedoch in dem Kanal höhere Werte für die Fluoreszenzintensität, in dem Tau-Proteine repräsentiert waren, vermutlich da es unter Pufferbedingungen eine stärkere Tendenz zur Aggregation aufwies als α -Synuklein (vgl. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) (Abb. 3.15-III-Tris, -IV-Tris).

Das Lösungsmittel DMSO oder der Alkohol Ethanol im Versuchsansatz zeigten einen

aggregationsfördernden Effekt auf die Bildung von Koaggregaten aus α -Synuklein und Tau-Proteinen. Die entstandenen Aggregate zeigten eine höhere Intensität des Fluoreszenzsignals in beiden Kanälen, verglichen mit den Punktwolken, die unter Puffer-Bedingungen entstanden waren (Abb. 3.15-III, -IV-DMSO, -EtOH).

Entsprechend den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2 wurde in Anwesenheit von NP40 keine effiziente Förderung der Aggregation von α -Synuklein detektiert, wohingegen sich für Tau-Protein im jeweiligen Kanal die Bildung von Aggregaten darstellen ließ. Eine effiziente Bildung zweifarbigter Koaggregate blieb aus. In diesem Konzentrationsbereich dominierte offenbar der Effekt von NP40 auf α -Synuklein über die Anwesenheit von Tau-Proteinen oder DMSO oder Ethanol und verhinderte somit die Entstehung von Koaggregaten (Abb. 3.15-III, -IV-NP40).

3.2.6 Untersuchung der Architektur von Koaggregaten mit Hilfe der FRET Analyse

Um eine Vorstellung von der Architektur der Oligomere zu erhalten, wurde die FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) Analyse (vgl. Abschnitt 2.11.3) verwendet. Der Versuchsaufbau entsprach dem des Koaggregations-Versuches (vgl. Abschnitt 3.2.5). Es wurden in zwei verschiedenen Farben markierte Proteine, Alexa488 und Alexa647, verwendet. Dieser Ansatz wurde in einer ersten Messung mit zwei Lasern mit den unterschiedlichen Wellenlängen 488 nm und 633 nm angeregt, wodurch rote und grüne Fluoreszenz direkt angeregt werden konnte. In einer zweiten Messung, im Folgenden „FRET-Messung“ genannt, wurde nur mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Wurden in der FRET-Messung zweifarbig Aggregate, also rot und grün fluoreszierende Moleküle detektiert, so konnte davon ausgegangen werden, dass eine Übertragung der Fluoreszenz von den grün fluoreszierenden Farbstoffen (Donor-Fluorophor) auf die roten Fluoreszenzfarbstoffe (Akzeptor-Fluorophor) mittels FRET stattgefunden hatte (vgl. Abschnitt 2.11.3 und 4.5.1). Ein Energietransfer konnte nicht gemessen werden, wenn nur einfach markierte Proteine, also entweder Donor oder Akzeptor, untersucht wurden [14].

Aus dem Prinzip des FRET (vgl. Abschnitt 2.11.3 und 4.5.1) ergibt sich, dass dieser nur gemessen werden kann, wenn in der Anregung mit beiden Lasern zweifarbig fluoreszierende Aggregate in ausreichender Helligkeit detektierbar waren. Wenn kaum Aggregate oder Koaggregate entstanden, wie unter Tris-Puffer-Bedingungen oder in Gegenwart von NP40, konnte auch kein FRET zur Darstellung gebracht werden (Abb. 3.16-Tris, -NP40).

Wurde die (Ko-)Aggregation mit Hilfe von DMSO oder Ethanol angeregt, so ließ sich in der FRET-Messung ein deutliches FRET Signal detektieren (Abb. 3.16-DMSO, -EtOH).

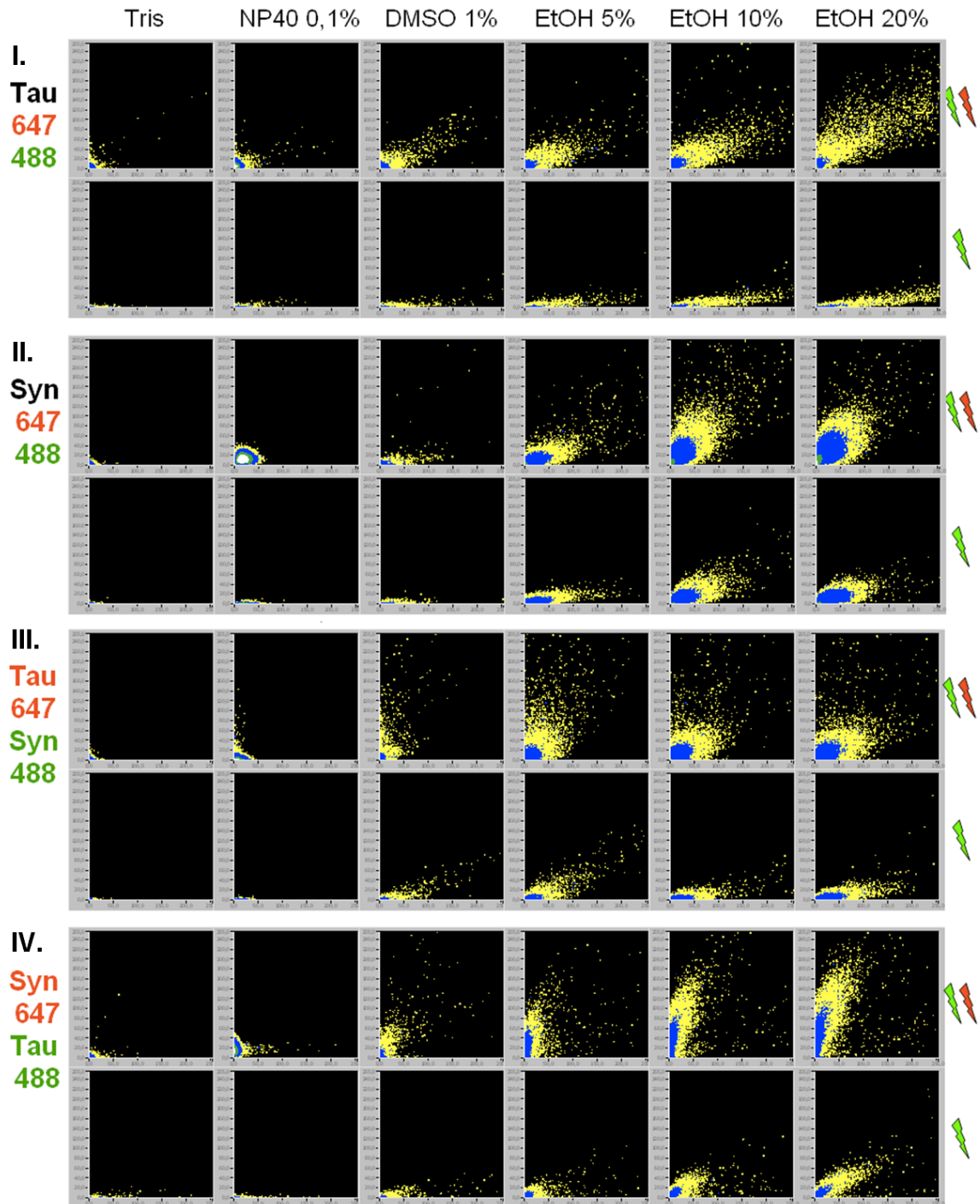


Abb. 3.16: Koaggregationsversuch mit FRET Analyse. Die 2D-Intensitätshistogramme repräsentieren das Aggregationsverhalten von α -Synuklein und Tau-Protein in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit NP40 0,1 %, DMSO 1 % oder Ethanol (5 %, 10 %, 20 %). Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5 (I.). Die Partikelzahl der α -Synukleine betrug in beiden Kanälen ca. 18 (II.). In den Koaggregationsansätzen war das Verhältnis der Partikelzahl von Tau-Protein und α -Synuklein ca. 1 zu 4 (III., IV.). Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

3.3 Aggregationsverhalten auf Fibrillenebene

3.3.1 Herstellung von Amyloidfibrillen

Für diese Versuchsreihe wurden Tau-Fibrillen und α -Synuklein-Fibrillen hergestellt. Die Bildung amyloider Fibrillen wurde mittels Thioflavin T Fluoreszenz überprüft (vgl. Abschnitt 2.8) [12, 174]. Bei Anregung mit 450 nm lag das Emissionsmaximum bei 490 nm, wobei das Signal proportional zu den vorhandenen Amyloidfibrillen im Probenvolumen war. Zudem wurden diese Amyloidfibrillen mittels der Transmissions-Elektronenmikroskopie (vgl. 2.9) visualisiert und im Folgenden mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie (vgl. Abschnitt 2.11) hinsichtlich ihrer Effekte im Aggregationsprozess untersucht.

Tau-Fibrillen

Das Vorhandensein von amyloiden Tau-Fibrillen (vgl. Abschnitt 2.7.1) wurde mittels der Thioflavin T Bindungsreaktion nachgewiesen (Abb. 3.17).

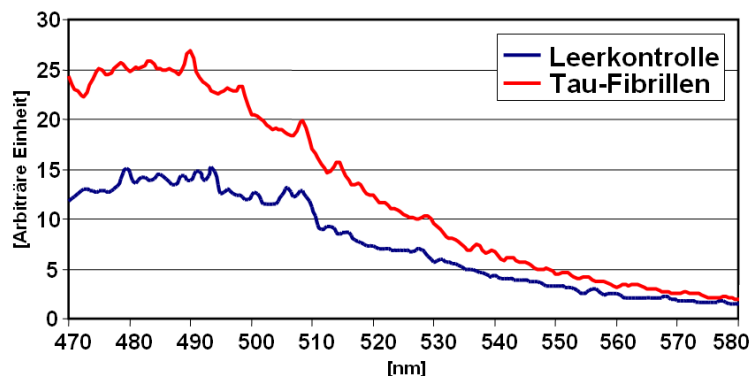


Abb. 3.17: Darstellung von Tau-Fibrillen (siehe Abschnitt 2.7.1) mit der Thioflavin T Bindungsreaktion. Der Graph entspricht der Messung der Tau-Fibrillen am Tag 3 nach der Inkubation (rote Kurve). Die blaue Kurve dient als Kontrolle.

Zusätzlich wurden die Tau-Fibrillen mittels der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) (vgl. Abschnitt 2.9) dargestellt. Es konnten stäbchenförmige, teils leicht gekrümmte fibrilläre Strukturen gezeigt werden (Abb. 3.18).

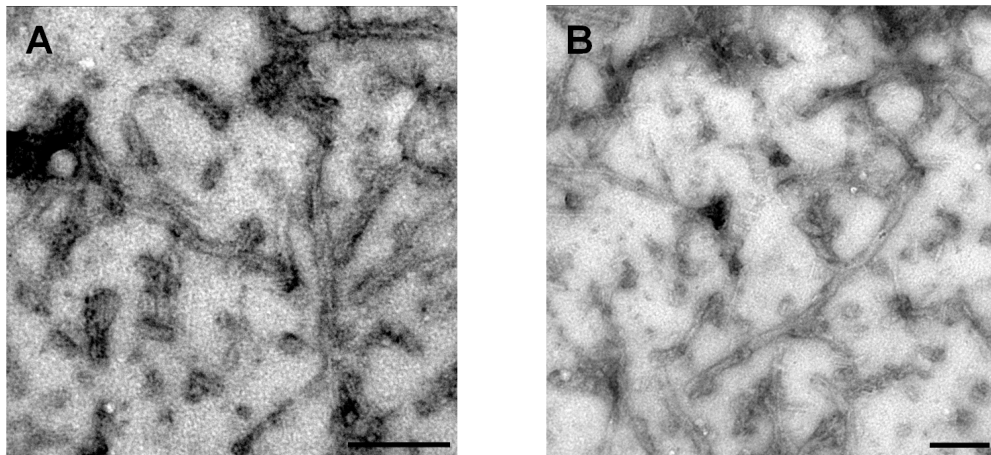


Abb. 3.18: Tau-Fibrillen visualisiert im TEM. A) 31.500-fach vergrößert, B) 20.000-fach vergrößert. Der Maßstabsbalken beschreibt 200 nm. Die Fibrillen wurden mit 2 % Uranylacetatlösung gefärbt, auf ein karbonisiertes Kupfernetz aufgetragen und anschließend im TEM visualisiert.

α -Synuklein-Fibrillen

α -Synuklein-Fibrillen (vgl. Abschnitt 2.7.2) wurden entsprechend den Tau-Fibrillen mit der Thioflavin T Bindungsreaktion und der Änderung der Emission bei 490 nm nachgewiesen (Abb. 3.19).

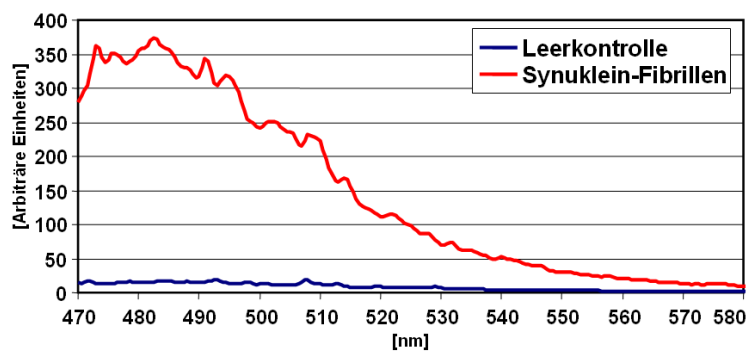


Abb. 3.19: Darstellung von α -Synuklein-Fibrillen (vgl. Abschnitt 2.7.2) mit der Thioflavin T Bindungsreaktion. Der Graph entspricht der Messung der α -Synuklein-Fibrillen am Tag 49 nach Inkubation (rote Kurve). Die blaue Kurve dient als Kontrolle.

In der TEM (vgl. Abschnitt 2.9) ließen sich α -Synuklein-Fibrillen als stäbchenförmige, fibrilläre Strukturen visualisieren (Abb. 3.20).

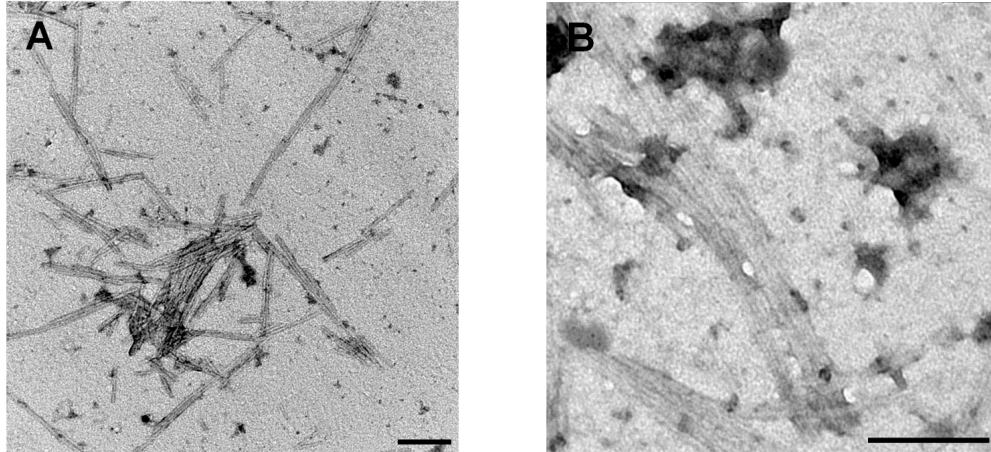


Abb. 3.20: α -Synuklein-Fibrillen im TEM. A) 16.500-fach vergrößert, B) 40.000-fach vergrößert. Der Maßstabsbalken beschreibt 200 nm. Die Fibrillen wurden mit 2 % Uranylacetatlösung gefärbt, auf ein karbonisiertes Kupfernetz aufgetragen und anschließend im TEM visualisiert.

3.3.2 Versuchsdesign

Tau-Protein und α -Synuklein lagen als Fibrillen bzw. als Monomere vor. Die Fibrillen waren dabei jeweils mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das jeweilige Monomer wurde mit einer grünen Fluoreszenzmarkierung versehen verwendet. Um eine Bildung oligomerer Aggregate zu induzieren, wurde das Monomer 30 Minuten in DMSO vorinkubiert. Durch die zuvor gewonnenen Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass dadurch eine oligomere Aggregatbildung induziert wurde (vgl. Abschnitt 3.2).

Der Ansatz wurde sowohl im „homologen System“

- Tau-Fibrillen und Tau-Monomer/-Oligomer
- α -Synuklein-Fibrillen und α -Synuklein-Monomer/-Oligomer

als auch im „heterologen System“ analysiert

- Tau-Fibrillen und α -Synuklein-Monomer/-Oligomer
- α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Monomer/-Oligomer

Es wurden parallel drei Ansätze analysiert:

1. Die jeweiligen Monomere wurden mit den Tau- bzw. α -Synuklein-Fibrillen unter Standard-Pufferbedingungen (Tris-Puffer) untersucht (Abb. 3.21-I).
2. Eine oligomere Aggregatbildung wurde durch Zugabe von DMSO über einen Zeitraum von 30 Minuten induziert. Zu diesen präformierten Oligomeren wurden im Anschluss die Fibrillen hinzugefügt (Abb. 3.21-II).
3. Monomere und Fibrillen wurden in Gegenwart des aggregationsfördernden DMSO analysiert (Abb. 3.21-III).

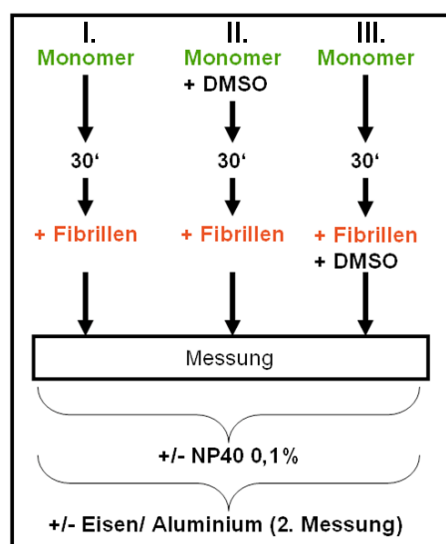


Abb. 3.21: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es wurden sowohl Monomere (ohne (I.) oder mit (III.) DMSO 1 %) als auch präformierte oligomere Aggregate (30 Minuten mit DMSO 1 % vorinkubiert, II.) unter verschiedenen Milieubedingungen jeweils zusammen mit den Fibrillen untersucht.

Diese drei Ansätze wurden parallel ebenfalls in Gegenwart des Tensids NP40 gemessen und in einer anschließenden zweiten Messung unter Zugabe von Eisen- oder Aluminiumionen untersucht (Abb. 3.21).

In den folgenden Versuchen, die mit Hilfe der 2D-SIFT Auswertung (vgl. Abschnitt 2.11.3) analysiert wurden, repräsentierten die 2D-Intensitätshistogramme jeweils die Summe von drei Einzelmessungen mit einer Messzeit von insgesamt 30 Sekunden pro Abbildung. Der weitere Versuchsaufbau wird in Abschnitt 2.10.5 ausführlich beschrieben.

3.3.3 α -Synuklein-Fibrillen im homologen System

α -Synuklein-Fibrillen und α -Synuklein-Monomer wurden unter Tris-Puffer-Bedingungen gemeinsam untersucht, wobei zweifarbige Aggregate nur in geringer Anzahl detektiert wurden, d. h. eine Interaktion zwischen Fibrillen und Monomer fand kaum statt. Im grünen Kanal waren nur wenige Aggregate beobachtbar, da α -Synuklein unter Pufferbedingungen kaum aggregatorisches Potential aufwies (vgl. Abschnitt 3.2.2). Im roten Kanal wurden helle Aggregate detektiert, die die präformierten fibrillären Aggregate repräsentierten (Abb. 3.22-A).

Wurde α -Synuklein-Monomer 30 Minuten mit DMSO vorinkubiert und somit eine Oligomer-Bildung induziert, konnten im grünen Kanal helle α -Synuklein-Aggregate entlang der x-Achse detektiert werden. Im roten Kanal waren wie in Abb. 3.22-A die Fibrillen, die nach den 30 Minuten Vorinkubationszeit hinzugefügt wurden, als helle Aggregate entlang der y-Achse sichtbar. Eine Interaktion der α -Synuklein-Oligomere mit den α -Synuklein-Fibrillen wurde jedoch nicht detektiert (Abb. 3.22-B).

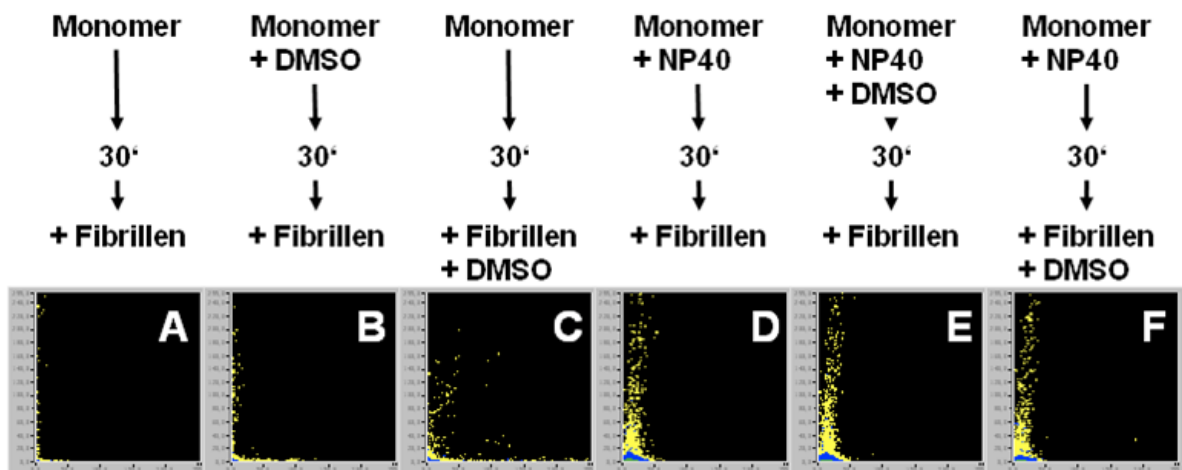


Abb. 3.22: α -Synuklein-Fibrillen im homologen System: Das Aggregationsverhalten der α -Synukleine auf Monomer (Alexa488)-, Oligomer (Alexa488)- und Fibrillen (Alexa647)-Ebene. Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 12. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Bei der Untersuchung von α -Synuklein-Fibrillen zusammen mit α -Synuklein-Monomeren in Gegenwart von DMSO konnte eine Interaktion der Monomere mit den Fibrillen festgestellt werden. In den 2D-Intensitätshistogrammen wurden zweifarbige Aggregate detektiert. Zusätzlich konnten die durch DMSO induzierten rein grünen α -Synuklein-Oligomere und rein rote α -Synuklein-Fibrillen beobachtet werden (Abb. 3.22-C).

In Gegenwart von NP40 aggregierten α -Synuklein-Fibrillen und α -Synuklein-Monomer nicht miteinander. Es wurden keine zweifarbigen Aggregate in den 2D-Intensitätshistogrammen detektiert. Eine Aggregation des α -Synuklein-Monomers zu Oligomeren fand nicht statt, da das α -Synuklein-Protein als Monomer durch NP40 in Lösung gehalten wurde und dieser Effekt stärker war als der von DMSO (vgl. Abschnitt 3.2.2). Im roten Kanal wurden die rot fluoreszierenden Fibrillen beobachtet. Diese präexistenten Fibrillen ließen sich durch NP40 nicht auflösen. Aufgrund der in NP40 haltigem Puffer höheren Konzentration des grün markierten Monomers (aufgrund geringer Adsorption an die Messkammer) ist die mittlere Helligkeit im grünen Kanal höher und daher die Punktwolke der roten Fibrillen in den 2D-Intensitätshistogrammen nach rechts verschoben (Abb. 3.22-D, -E, -F).

Zusammenfassend kann über das Aggregationsverhalten der α -Synuklein-Fibrillen im homologen System gesagt werden, dass

- α -Synuklein-Monomere nur in Gegenwart eines Induktors (DMSO) effizient mit den α -Synuklein-Fibrillen interagieren konnten.
- α -Synuklein-Oligomere (DMSO) mit den Synuklein-Fibrillen keine effiziente Bindung eingehen konnten.
- die Gegenwart von NP40 die α -Synuklein-Oligomerbildung und die Interaktion der Monomere mit den α -Synuklein-Fibrillen hemmte.
- NP40 auf die präexistenten α -Synuklein-Fibrillen keinen auflösenden Effekt hatte.

3.3.4 Tau-Fibrillen im homologen System

Unter Tris-Puffer-Bedingungen konnte gezeigt werden, dass Tau-Monomere keine effiziente Interaktion mit Tau-Fibrillen eingehen konnten. Im grünen Kanal wurden Tau-Oligomere sichtbar, da Tau-Protein auch ohne Induktor aggregierte (vgl. Abschnitt 3.2.1). Im roten Kanal konnten Tau-Fibrillen als helle Aggregate unterschiedlicher Fluoreszenzintensität detektiert werden (Abb. 3.23-A).

Wurde Tau-Monomer 30 Minuten mit DMSO vorinkubiert und somit die Oligomerbildung verstärkt, so waren im grünen Kanal Tau-Oligomere detektierbar. Im roten Kanal waren die Fibrillen, die nach den 30 Minuten hinzugefügt wurden, als hellere Aggregate sichtbar. Zweifarbige Aggregate im Sinne einer effizienten Interaktion der präformierten Tau-Oligomere mit den Tau-Fibrillen konnten nicht gezeigt werden (Abb. 3.23-B).

Wurden Tau-Fibrillen zusammen mit Tau-Monomer in Gegenwart von DMSO untersucht, so war eine Interaktion der Monomere mit den Fibrillen festzustellen. Es zeigten sich zahlreiche zweifarbige Aggregate in den 2D-Intensitätshistogrammen. Des Weiteren wurden Tau-Fibrillen als rote Aggregate und durch DMSO induzierte Tau-Oligomere als grüne Aggregate sichtbar (Abb. 3.23-C).

Die Gegenwart von NP40 wirkte grundsätzlich fördernd auf das Aggregationsverhalten von Tau-Proteinen (vgl. Abschnitt 3.2.1). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob Tau-Fibrillen und Tau-Monomere in Tris-Puffer und NP40 vorlagen (Abb. 3.23-D), ob diesem Ansatz später der Induktor DMSO hinzugefügt wurde (Abb. 3.23-F) oder ob Tau-Monomer 30 Minuten in DMSO und NP40 vorinkubiert wurde und erst im Anschluss die Fibrillen hinzugefügt wurden (Abb. 3.23-E). In allen drei Ansätzen konnten die Fibrillen als hochintense Aggregate entlang der y-Achse und Tau-Oligomere entlang der x-Achse dargestellt werden. Zusätzlich konnten viele zweifarbige Aggregate detektiert werden, woraus geschlossen wurde, dass in Anwesenheit von NP40 eine effizientere Interaktion zwischen Tau-Monomeren bzw. -Oligomeren und Tau-Fibrillen stattfand (Abb. 3.23-D, -E, -F).

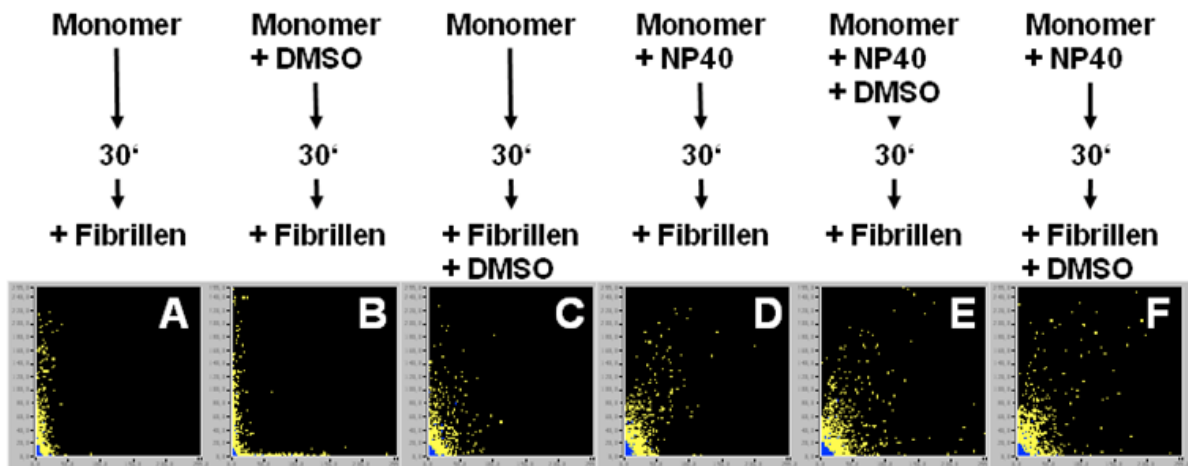


Abb. 3.23: Tau-Fibrillen im homologen System: Das Aggregationsverhalten der Tau-Proteine auf Monomer (Alexa488)-, Oligomer (Alexa488)- und Fibrillen (Alexa647)-Ebene. Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Zusammenfassend lässt sich über das Aggregationsverhalten der Tau-Fibrillen im homologen System sagen, dass

- Tau-Monomere unter Tris-Puffer-Bedingungen nicht, sondern nur in Gegenwart

eines Aggregations-Induktors (DMSO/NP40) mit den Tau-Fibrillen aggregieren konnten.

- die Tau-Oligomere, die durch DMSO induziert wurden, nicht effizient mit den Tau-Fibrillen interagieren konnten.
- die Oligomere, deren Bildung durch NP40 induziert wurde, eine Interaktion mit den Tau-Fibrillen aufzeigten.
- in Gegenwart von NP40 sowohl Tau-Monomere als auch -Oligomere eine effektive Bindung mit den Tau-Fibrillen eingehen konnten.

3.3.5 α -Synuklein und Tau-Protein im heterologen System

α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Monomer

α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Monomer interagierten unter Tris-Puffer-Bedingungen. Es waren zahlreiche zweifarbige Koaggregate unterschiedlicher Helligkeit in den 2D-Intensitätshistogrammen sichtbar. Entlang der y-Achse konnten jedoch keine fibrillären Aggregate mehr detektiert werden, da diese anscheinend vollständig in die zweifarbigen Koaggregate inkorporiert wurden. Entlang der x-Achse zeigten sich zahlreiche Tau-Oligomere (Abb. 3.24-A).

Wurden die Tau-Monomere mit DMSO für 30 Minuten vorinkubiert, dadurch eine Oligomerbildung induziert und im Weiteren die Fibrillen hinzugefügt, waren wie in Abb. 3.24-A zweifarbige Koaggregate zu erkennen. Die präformierten Tau-Oligomere schienen, ebenso wie die Tau-Monomere, mit den α -Synuklein-Fibrillen zu interagieren. Entlang der y-Achse waren keine Fibrillen zu sehen. Entlang der x-Achse waren Tau-Oligomere unterschiedlicher Fluoreszenzintensität detektierbar (Abb. 3.24-B).

Für die Untersuchung der Tau-Monomere und α -Synuklein-Fibrillen zusammen mit DMSO ergab sich ein Ergebnis entsprechend dem aus Abb. 3.24-A und -B. Es konnte eine Anlagerung der Monomere an die Fibrillen im Sinne einer zweifarbigen Koaggregation mit Inkorporation der Fibrillen detektiert werden, wobei zusätzlich Tau-Oligomere im grünen Kanal sichtbar waren (Abb. 3.24-C).

Wurde den oben besprochenen Ansätzen jeweils NP40 hinzugefügt, so stellte sich heraus, dass NP40 einen generell fördernden Einfluss auf die Interaktion der Tau-Monomere bzw. -Oligomere mit den α -Synuklein-Fibrillen hatte. Dies war unabhängig davon, ob ein zusätzlicher Aggregations-Induktor wie z. B. DMSO hinzugefügt wurde (Abb. 3.24-F), oder ob im Voraus eine verstärkte Oligomer-Bildung induziert wurde (Abb. 3.24-E). Die Koaggregation wurde durch NP40 also tendenziell gefördert. Dieser Effekt ließ sich

auch in Gegenwart von DMSO verzeichnen, was an den sehr hellen zweifarbig fluoreszierenden Aggregaten zu erkennen war. Entlang der y-Achse wurden keine fibrillären Aggregate mehr detektiert (Abb. 3.24-D, -E, -F).

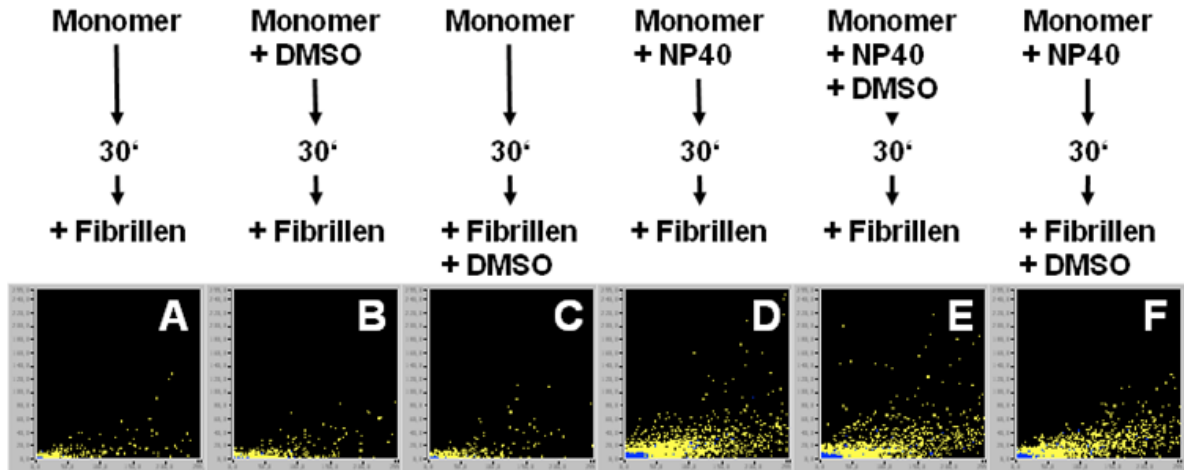


Abb. 3.24: α -Synuklein-Fibrillen im heterologen System: Das Koaggregationsverhalten von α -Synuklein-Fibrillen (Alexa647) mit Tau-Monomeren und -Oligomeren (Alexa488). Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Zusammenfassend lässt sich zum Aggregationsverhalten im heterologen System zwischen α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Monomer bzw. -Oligomer sagen, dass

- das aggregationsfreudige Tau-Monomer auch ohne Induktor, nur in Tris-Puffer, eine Bindung mit den α -Synuklein-Fibrillen einging.
- sowohl Tau-Monomere, als auch Tau-Oligomere in Gegenwart des Induktors DMSO mit den α -Synuklein-Fibrillen interagieren konnten.
- das Hinzufügen von NP40 einen tendenziell fördernden Einfluss auf oben beschriebene Prozesse hatte.
- das Fehlen von Aggregaten entlang der y-Achse der 2D-Intensitätshistogramme darauf schließen ließ, dass die Fibrillen nahezu vollständig in die zweifarbig fluoreszierenden Koaggregate inkorporiert wurden.

Tau-Fibrillen und α -Synuklein-Monomer

Tau-Fibrillen und α -Synuklein-Monomere zeigten unter Tris-Puffer-Bedingungen keine Koaggregation. Zweifarbig fluoreszierende Aggregate waren nicht detektierbar. Entlang

der x-Achse konnten kaum hochintense Aggregate beobachtet werden, da α -Synuklein ohne Aggregationsinduktor nur schwach selbst aggregierte (vgl. Abschnitt 3.2.2). Entlang der y-Achse waren die Tau-Fibrillen als unterschiedlich helle Aggregate zu sehen (Abb. 3.25-A).

Wurden α -Synuklein-Monomere mit DMSO für 30 Minuten vorinkubiert und die Tau-Fibrillen im Anschluss daran hinzugefügt, konnten zweifarbige Koaggregate zwischen den α -Synuklein-Oligomeren und Tau-Fibrillen gezeigt werden. Entlang der y-Achse waren Tau-Fibrillen detektierbar. Entlang der x-Achse konnten präformierte α -Synuklein-Oligomere beobachtet werden (Abb. 3.25-B).

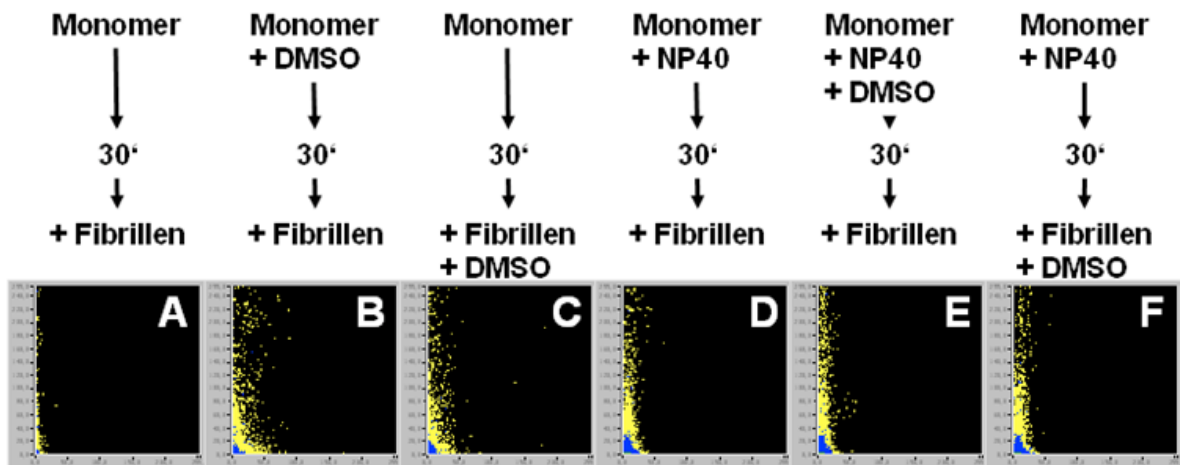


Abb. 3.25: Tau-Fibrillen im heterologen System: Das Koaggregationsverhalten von Tau-Fibrillen (Alexa647) mit α -Synuklein-Monomeren und -Oligomeren (Alexa488). Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 18. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

Eine zeitgleiche Untersuchung von α -Synuklein-Monomeren mit Tau-Fibrillen und DMSO zeigte ein Ergebnis entsprechend dem aus Abb. 3.25-B. Koaggregation zwischen α -Synuklein-Monomer und Tau-Fibrillen wurde effizient induziert, sichtbar an zweifarbig hellen Aggregaten. Zusätzlich waren entlang der y-Achse Tau-Fibrillen als helle Aggregate sichtbar und entlang der x-Achse α -Synuklein-Oligomere als unterschiedlich große Aggregate (Abb. 3.25-C).

Das Hinzufügen von NP40 zu den oben besprochenen Ansätzen zeigte einen hemmenden Einfluss von NP40 auf die Interaktion der α -Synuklein-Monomere bzw. -Oligomere mit den Tau-Fibrillen. Die Aggregation von α -Synuklein-Monomeren zu -Oligomeren wurde durch NP40 tendenziell gehemmt, was in den 2D-Intensitätshistogrammen beobachtbar

war, da entlang der x-Achse kaum fluoreszierende Aggregate detektiert werden konnten (vgl. Abschnitt 3.2.2). Der Effekt von NP40 war in diesem Konzentrationsbereich unabhängig von der Gegenwart von DMSO. Entlang der y-Achse wurden die Tau-Fibrillen als unterschiedlich helle Aggregate dargestellt, die auch in Gegenwart von NP40 bestehen blieben (Abb. 3.25-D, -E, -F).

Zusammenfassend kann über das Aggregationsverhalten im heterologen System zwischen Tau-Fibrillen und α -Synuklein -Monomer bzw. -Oligomer gesagt werden, dass

- sowohl Tau-Monomere als auch Tau-Oligomere in Gegenwart von DMSO eine Interaktion mit den α -Synuklein-Fibrillen zeigten.
- das wenig aggregationsfreudige α -Synuklein-Monomer ohne Aggregations-Induktor unter Tris-Puffer-Bedingungen keine effiziente Koaggregation mit den α -Synuklein-Fibrillen eingehen konnte.
- das Hinzufügen von NP40 einen hemmenden Einfluss auf oben beschriebene Prozesse hatte, d. h. eine Koaggregation zwischen Tau-Fibrillen und α -Synuklein-Monomer fand in Gegenwart von NP40 nicht statt, auch nicht in Gegenwart des Induktors DMSO.

3.3.6 Wirkung von Eisenionen auf das Aggregationsverhalten von Fibrillen

Für Eisenionen konnte auf Oligomerebene eine proaggregatorische Wirkung gezeigt werden. Sowohl im homologen als auch im heterologen System wirkte es als starker Induktor der (Ko-)Aggregation von α -Synuklein und Tau-Protein (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 4.4).

Auch auf Fibrillenebene wirkten dreiwertige Eisenionen als Induktor von Koaggregationsprozessen, sowohl im homologen als auch im heterologen System. Die Interaktion der Monomere oder Oligomere mit den Fibrillen wurde effizient gefördert (Abb. 3.26).

Wurden α -Synuklein-Monomere in Gegenwart von Eisenionen mit α -Synuklein- oder Tau-Fibrillen kombiniert und unter Tris-Puffer-Bedingungen untersucht, waren reine α -Synuklein-Oligomere entlang der x-Achse kaum detektierbar. Koaggregate im Sinne einer Interaktion der Monomere mit den Fibrillen konnten ebenfalls nicht detektiert werden. In Anwesenheit von NP40 dagegen, das wie oben gezeigt auf α -Synuklein eigentlich einen aggregationshemmenden Einfluss hatte (vgl. Abschnitt 3.3.3 und 3.3.5), war der aggregationsfördernde Effekt von Eisenionen stärker als die aggregationshemmende Wirkung von NP40. Innerhalb der untersuchten Konzentrationsbereiche wirkte Eisen auch in Kombination mit NP40 als potenter Induktor der Aggregation und Koaggregation auf α -Synuklein.

Die Wirkung der dreiwertigen Eisenionen auf Tau-Monomere/-Oligomere in Kombination mit α -Synuklein- oder Tau-Fibrillen bestand in einer Förderung ihrer Aggregation und Koaggregation. Dieser Prozess fand unabhängig von den Milieubedingungen, wie der Anwesenheit des Induktors DMSO oder des Detergens NP40 oder von beiden, statt.

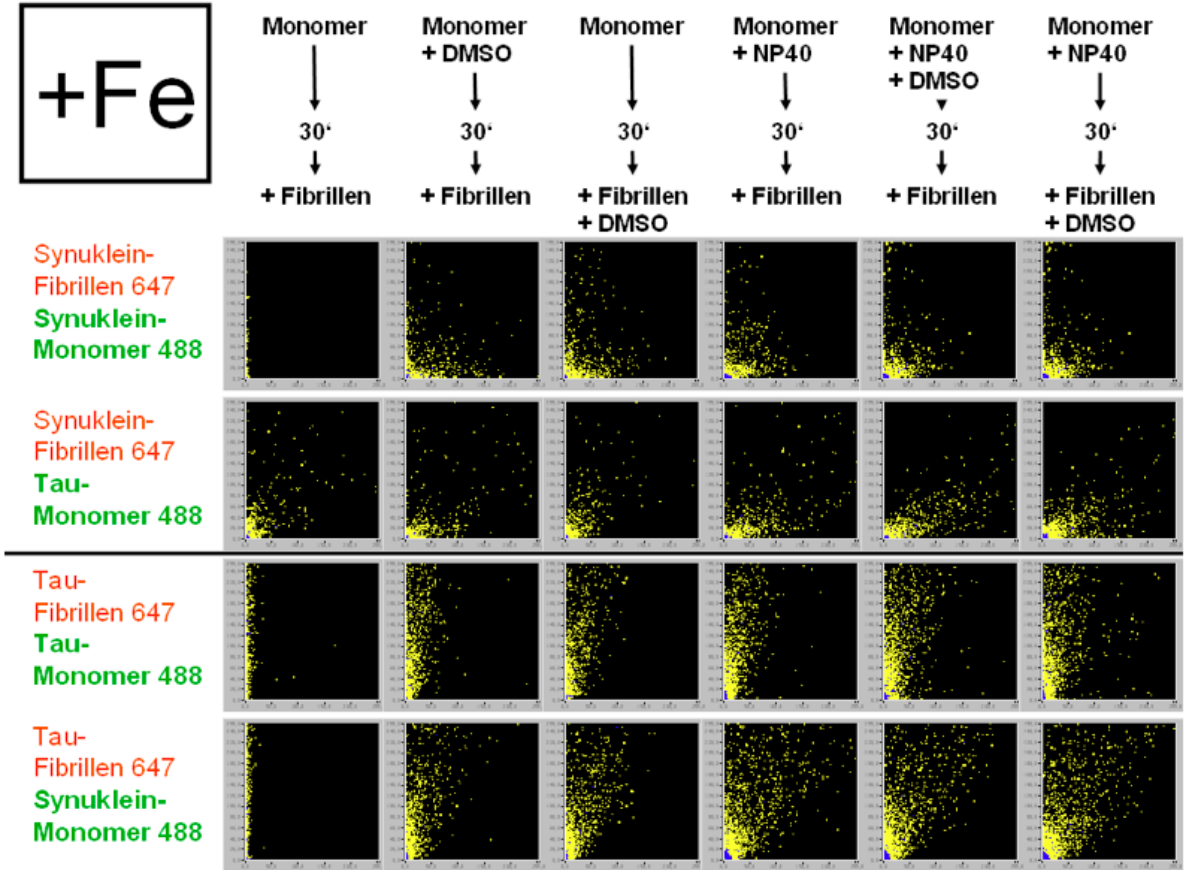


Abb. 3.26: Untersuchung des Koaggregationsverhaltens von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-Ebene nach Zugabe von Eisenionen (Fe^{3+} , $10 \mu\text{M}$) in einer zweiten Messung des Versuchsaufbaus. Die α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Fibrillen waren im Verhältnis 1:1000 mit Alexa647 markiert. Für α -Synuklein (Alexa488) betrug die Partikelzahl ca. 12 - 18. Tau-Protein (Alexa488) zeigte eine Partikelzahl von ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Skalierung ist analog zu Abb. 3.2.

3.3.7 Wirkung von Aluminiumionen auf das Aggregationsverhalten von Fibrillen

Für Aluminiumionen konnte auf Oligomerebene ebenfalls eine proaggregatorische Wirkung gezeigt werden. Es wirkte sowohl im homologen als auch im heterologen System als starker Induktor der (Ko-)Aggregation von α -Synuklein und Tau-Proteinen (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 4.4).

Wurden die α -Synuklein- oder Tau-Monomere jeweils mit den Fibrillen in Gegenwart von dreiwertigen Aluminiumionen kombiniert und ohne Induktor unter Tris-Puffer-Bedingungen untersucht, konnte eine aggregationsfördernde Wirkung im Sinne einer Interaktion der Monomere mit den Fibrillen detektiert werden. Aluminiumionen wirkten hier, anders als Eisenionen, als starker Induktor auf die Aggregation und Koaggregation der Proteine. In Gegenwart von NP40, das auf α -Synuklein eigentlich aggregationshemmend wirkte (vgl. Abschnitt 3.3.3 und 3.3.5), dominierte innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches der aggregationsfördernde Effekt von Aluminium. Die zusätzliche Gegenwart von DMSO, mit oder ohne NP40, führte ebenfalls sowohl im homologen als auch im heterologen System zu zahlreichen (Ko-)Aggregaten.

Auf das Aggregationsverhalten des Tau-Proteins wirkte die Gegenwart von Aluminium ohne Induktor, mit dem Induktor DMSO und auch in Gegenwart von NP40 aggregationsfördernd. Dieser Prozess war sowohl im homologen als auch im heterologen System zu beobachten.

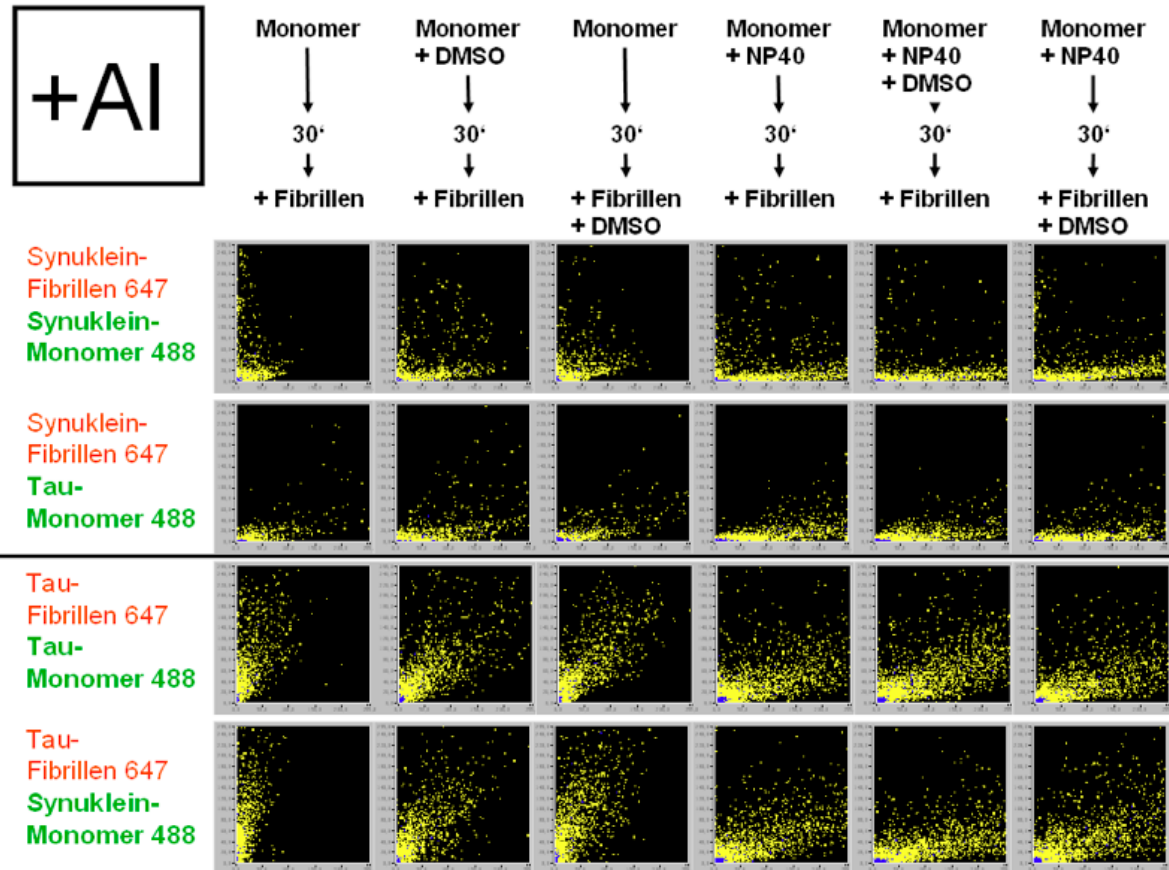


Abb. 3.27: Untersuchung des Koaggregationsverhaltens von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-Ebene nach Zugabe von Aluminiumionen (Al^{3+} , $10 \mu\text{M}$) in einer zweiten Messung des Versuchsaufbaus. Die α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Fibrillen waren im Verhältnis 1:1000 mit Alexa647 markiert. Für α -Synuklein (Alexa488) betrug die Partikelzahl ca. 12 - 18. Tau-Protein (Alexa488) zeigte eine Partikelzahl von ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.

4 Diskussion

4.1 Proteinaggregate in der molekularen Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch einen fortschreitenden Untergang von Neuronenpopulationen im zentralen Nervensystem aus. Der gemeinsame Mechanismus vieler neurodegenerativer Erkrankungen ist die Aggregation und Ablagerung von krankheitsspezifischen fehlgefalteten Proteinen, die zu zentralnervöser Amyloidose führen [86]. So werden zum Beispiel Ablagerungen von Tau-Protein und $A\beta$ bei M. Alzheimer, von α -Synuklein bei M. Parkinson, von Huntingtin bei M. Huntington, von TDP-43 bei der frontotemporalen Lobärdegeneration und von Prion-Proteinen bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung gefunden [16, 29, 138, 182, 196] (vgl. Abschnitt 1.1). Lösliche Proteine werden auf diese Weise allmählich in unlösliche filamentäre Polymere umgewandelt mit charakteristischer β -Faltblattstruktur. Diese Gebilde akkumulieren und reichern sich in proteinspezifischer Art als fibrilläre Amyloidablagerungen im Zytosol, in den Kernen der betroffenen Nervenzellen (Neuronen und Gliazellen) oder im Extrazellulärraum an [55, 111]. Die Transformation der normalen Proteine in die pathologische Konformation scheint sich über intermediäre Stufen zu entwickeln, die Protofibrillen, Protofilamente oder Oligomere genannt werden [53, 98, 120, 230]. Sie resultiert schlussendlich in neurotoxischen Eigenschaften, bis hin zu Dysfunktion oder dem Tod der betroffenen ZNS Zellen [86]. So scheinen die Ablagerungen dieser aggregierten Proteine, ihre Entstehung oder ihre oligomeren intermediären Vorstufen eine zentrale Rolle bei der Nervenzellschädigung und damit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankung zu spielen [1, 29, 90, 211] (vgl. Abschnitt 1.1).

Die molekularen Mechanismen und Reaktionsbedingungen, unter denen diese krankheitsassoziierten toxischen Aggregate entstehen, sowie deren biophysikalische und funktionelle Eigenschaften sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Deshalb besteht ein elementarer Gedanke der Grundlagenforschung darin, die vorgeschalteten molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen führen, zu identifizieren und den neurotoxischen Aggregationsweg der spezifischen Proteine auf unterschiedlichen Ebenen näher zu erforschen, zu verstehen und in einem robusten Modellsystem nachzustellen. Die Identifizierung dieser Mechanismen wird die Entwicklung von effektiveren therapeutischen Strategien erleichtern, um damit langfristig den Betroffenen neue Diagnose- und Therapieoptionen zu Verfügung stellen zu können.

4.2 Einsatz und Möglichkeiten von FCS und SIFT

Zur Detektion und Charakterisierung dieser Proteinaggregate und der zugrunde liegenden Aggregationsprozesse konnten für die experimentelle Analyse einzelpartikelbasierte fluorezenzspektroskopische Verfahren verwendet werden [108, 188, 202, 203]. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und das später daraus entwickelte SIFT-Verfahren [19, 74] wurde in Forschungsarbeiten zu Proteinopathien wie der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung [107, 141, 189], der Alzheimerschen Erkrankung [197, 222] und dem Morbus Parkinson [73] vielseitig eingesetzt. So konnte diese Technik in der Grundlagenforschung etabliert werden und diente zudem der Entwicklung hochsensitiver Diagnoseverfahren [72, 73, 75, 141].

Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie weist gegenüber konventionellen Methoden besondere Vorteile auf:

- Es werden so genannte „high content“ Messungen durchgeführt. Das heißt, aus einer einzigen Messung können mittels verschiedener Analyseverfahren eine Fülle von Parametern bestimmt werden. So besteht die Möglichkeit, parallel Daten unter anderem zur Partikelzahl, Helligkeit der Partikel, Gesamthelligkeit in der Probe und zur Diffusionsgeschwindigkeit zu ermitteln.
- Die Versuche sind automatisierbar [17], wodurch eine hohe Anzahl von Parallelproben pro Versuch analysiert werden können. Dies ermöglicht auch bei starker Streuung der Messwerte, die bei Proteinaggregationsuntersuchungen oft Probleme bereiten, klare Ergebnisse zu gewinnen.
- Die Messzeiten für einzelne Proben liegen im Bereich von wenigen Sekunden. Dadurch lassen sich dynamische Prozesse, wie zum Beispiel die Aggregation von Proteinen, gut über einen bestimmten Zeitraum verfolgen. Zu beobachten ist hierbei zum Beispiel ein Absinken der Gesamt-Partikelzahl, während die Einzelpartikel immer langsamer und heller werden, sich also größere Aggregate formieren.
- Für die Messungen sind nur sehr geringe Proteinkonzentrationen im nano- bis subpicomolaren Bereich notwendig. Es können große Aggregate in äußerst geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Dies ist vor allem für Untersuchungen in physiologischen Metallionenkonzentrationen von großem Wert, da die hochaffinen Bindungspartner in adäquaten Mengenverhältnissen zueinander verwendet werden können.

Mit der Zweifarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie können darüber hinaus Koaggregationsprozesse verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierter Proteinspezies, die sich biochemisch kaum unterscheiden, analysiert werden (vgl. [72] und Abschnitt 2.11). Auf diesem gerätetechnischen Aufbau basiert das SIFT Verfahren, welches eine hochsensitive Nachweismethode für einzelne Proteinaggregate darstellt. Um die Aggregate mit

diesem Verfahren detektieren und charakterisieren zu können, werden die Proteine mit unterschiedlich fluoreszierenden Sondenmolekülen markiert. Anschließend werden sie getrennt voneinander detektiert und analysiert [72].

Das SIFT Verfahren bietet folgende weitere Möglichkeiten:

- Durch die SIFT Auswertung lassen sich besonders große Proteinaggregate in äußerst geringen Konzentrationen bis in den subfemtomolaren Bereich nachweisen (vgl. [19, 74] und Abschnitt 2.11.3).
- Mit der SIFT Auswertung kann der aggregatbedingte Signalanteil quantifiziert werden. Das Fluoreszenzsignal wird in sukzessiven Zeitintervallen konstanter Länge (sog. Bins) aufgezeichnet und ausgewertet. Die Zahl hochintensiver Bins wird als direktes Maß für die Konzentration und Größe der markierten Zielmoleküle gewertet (vgl. [72] und Abschnitt 2.11.3).
- Die 2D-FIDA Auswertung dient der Detektion der spezifischen Helligkeit von diffundierenden fluoreszierenden Molekülen in zwei unterschiedlichen Kanälen. Hiermit können Koaggregationsprozesse zwischen unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proteinspezies untersucht und visuell über 2D-Intensitätshistogramme dargestellt werden (vgl. Abschnitt 2.11.3).
- Durch die FRET Analyse, die einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer beschreibt, lässt sich die Struktur von Proteinaggregaten näher charakterisieren. Der FRET kann über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz detektiert werden und stellt ein optisches Nanometermaß dar. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um den architektonischen Aufbau von Koaggregaten zwischen Tau-Protein und α -Synuklein näher zu charakterisieren (vgl. Abschnitt 2.11.3).

4.3 Etablierung eines Aggregationsmodells zur Untersuchung der Aggregation und Koaggregation von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillenebene

Ziel dieser Arbeit war es, zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beizutragen, im Speziellen Tauopathien und Synukleinopathien. Als Grundlage hierfür wurde das Aggregationsverhalten von Tau-Proteinen (vgl. Abschnitt 3.2.1, 3.2.3, 3.2.4) und α -Synuklein (vgl. Abschnitt 3.2.2), sowie das Verhalten dieser beiden Proteine in der Koaggregation näher charakterisiert (vgl. Abschnitt 3.2.5, 3.2.6, 3.3). Als Basis für diese Untersuchungen und die weiteren

Experimente dieser Dissertation wurde für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie ein *in vitro* Modellsystem zur Analyse von Proteinaggregation auf Einzelmolekülebene verwendet und weiterentwickelt, das bereits in anderen Doktorarbeiten des ZNP etabliert wurde (vgl. [10, 98, 140]). Es wird dem Anspruch nach Reproduzierbarkeit, Robustheit, Regulierbarkeit und Spezifität gerecht und zeichnet sich durch folgende Eigenschaften und Vorteile aus:

- Unter Einsatz von Induktoren der Aggregation wie DMSO oder Ethanol konnten im Bereich nanomolarer Proteinkonzentrationen nach wenigen Minuten Tau-Protein- und α -Synuklein-Aggregate nachgewiesen werden. An dieser Stelle konnten im Vergleich zu anderen Studien, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden, somit völlig neue Erkenntnisse im Bereich der Aggregatbildung gewonnen werden, da die verwendete Methode im Besonderen Analysen auf Einzelmolekülebene bei sehr geringen Proteinkonzentrationen und äußerst kurzen Inkubationszeiten ermöglicht [5, 34, 53, 101, 120, 228, 230].
- Ein weiterer Vorteil der unter diesen Bedingungen durchgeführten Versuche war die gezielte Induktion und aktive Kontrolle von Aggregationsprozessen durch die Verwendung von Aggregationsinduktoren wie organische Lösungsmittel. Es wurde beschrieben, dass diese organischen Lösungsmittel die Konformation von Tau-Proteinen verändern und einen intrinsischen proaggregatorischen Einfluss aufweisen [96, 166]. Ausserdem scheinen sie eine Verbindung zwischen *in vitro* und *in vivo* Experimenten herzustellen, da sie in niedrigen Konzentrationen in Puffersystemen ein Milieu erschaffen, das der Umgebung von Lipidmembranen ähnelt [170].
- Konventionelle Methoden wie die Thioflavin T Fluoreszenz, die Lichtstreuung oder die Proteinase K Resistenz, die zur Erfassung und Quantifizierung von Proteinaggregaten und Amyloidbildung dienen, können nur die Gesamtmenge des aggregierten Proteins messen. Diese Methoden können folglich nicht zwischen Aggregaten differenzieren, die aus mehreren verschiedenen Proteinen aufgebaut sind oder einer Mischung von Proteinaggregaten, die jeweils aus einem Protein bestehen. Mit Hilfe der konfokalen einzelmolekülbasierten Fluoreszenzspektroskopie lässt sich jedoch genau dies untersuchen [17, 19, 74, 75, 188, 189, 201]. Unter anderem wurde dies durch die Fluoreszenzmarkierung der Proteine mit unterschiedlichen Farbstoffen ermöglicht, wobei die aggregativen Eigenschaften der Proteine durch die Markierung mit den Succinimidylester Fluoreszenzfarbstoffen Alexa488 und Alexa647 nicht beeinflusst wurden. Dies zeigten Versuche, die mit Hilfe der CD-Spektroskopie, der Westernblotanalyse, der AFM-Analyse und der Einzelporenelektrophysiologie durchgeführt wurden. In diesen Analysen konnten keine Unterschiede im Verhalten der markierten und der unmarkierten Proteine nachgewiesen werden [10, 98].
- Da mit der angewendeten Methode eine Differenzierung zwischen Monomer und

Oligomer möglich war, zudem eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Proteinen erfolgen konnte, sowie Koaggregate unterschiedlicher Molekülspezies effizient detektiert werden konnten, wurde in dieser Arbeit eine dritte Ebene untersucht, die sogenannte „Fibrillenebene“. Amyloide Aggregate, die *in vivo* meist den Endzustand der als stufenartig proklamierten Proteinaggregation darstellen (vgl. Abschnitt 1.1 und Abb. 1.2), konnten mit der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie nicht direkt als fibrilläre Aggregate differenziert werden. So wurde, den Versuchen voran gehend, ihr amyloider Charakter mit der Thioflavin T Fluoreszenz (vgl. Abschnitt 2.8) verifiziert und mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (vgl. Abschnitt 2.9 und 3.3.1) visualisiert. Zudem wurden die amyloiden Aggregate mittels der für die Einzelmolekülspektroskopie nötigen Fluoreszenzmarkierung erkennbar gemacht. In dieser Dissertation wurde für die Fibrillen durchgehend der Farbstoff Alexa647 verwendet (vgl. Abschnitt 3.3.1). So wurden die Fibrillen in der Fluoreszenzspektroskopie einsetzbar und ihr Aggregationsverhalten mit Monomeren und Oligomeren konnte näher untersucht werden (vgl. Abschnitt 3.3 und 4.5.2).

4.4 Das Verhalten von Tau-Protein-Aggregaten

Neurodegenerative Erkrankungen teilen eine bemerkenswerte Zahl gemeinsamer pathologischer Besonderheiten und Ereignisse. Zusätzlich zur Anreicherung von Amyloidfibrillen (vgl. Abschnitt 1.1 und 4.1) zeigen diese Erkrankungen ebenfalls den Nachweis von Membranschäden, ein Ionen- und Metallungleichgewicht, mitochondriale Dysfunktion, eine anormale Signaltransduktion, erhöhte Autophagie und den Zelltod [76, 77]. Welche Mechanismen sind ursächlich verantwortlich? Sind sie durch eine kausale Abfolge miteinander verbunden? Durch *in vitro* Versuche konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die eine Aggregation von Tau-Proteinen induzieren können [64, 136, 204, 209, 240].

So setzten sich zahlreiche Veröffentlichungen in den letzten Jahren mit dem Verhältnis von Metallen zu neurodegenerativen Erkrankungen [15, 75, 141, 227], unter anderem dem M. Alzheimer [150, 190], auseinander. Es konnte bewiesen werden, dass bei diesen Erkrankungen redoxaktive Metalle als Mediatoren für oxidativen Stress dienen und zur Produktion von freien Radikalen führen [186, 191, 199]. Verschiedene Studien wurden mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt, um die Rolle von Aluminium, Eisen, Kupfer, Mangan und Zink in der Neurodegeneration bzw. der Alzheimer'schen Erkrankung zu erforschen. Hierbei wurde herausgefunden, dass speziell Aluminiumionen [123, 149, 157, 163, 171, 206, 209, 210] und Eisenionen [149, 238] eine proaggregatorische Wirkung auf das Aggregationsverhalten von Tau-Protein aufweisen. Eisen und Aluminium sind Metalle, die mit (hyper-)phosphoryliertem Tau-Protein assoziieren, zu seiner Aggregation führen, sich in den betroffenen Neuronen anreichern und zur Bildung von NFTs in Alzheimer beitragen [85, 157, 163, 208, 210, 212]. Ein Problem bei der Analyse

der Effekte von Eisen und Aluminium ist die Tatsache, dass die gängigen Methoden zur Untersuchung von Protein-Aggregationsprozessen meist hohe Konzentrationen von sowohl Protein als auch Induktor verwenden, so dass diese Versuche mit der physiologischen zytoplasmatischen Umgebung nicht vergleichbar sind. Die Konzentration der Metallionen in Studien an *post mortem* Gehirngewebe überschreitet jedoch selten einen Wert von 60 $\mu\text{mol/kg}$ Nassgewicht [2, 158, 161].

Mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wurden die unterschiedlichen Effekte verschiedener Metallionen auf das Aggregationsverhalten von Tau-Protein in physiologischen Konzentrationen untersucht. Im Speziellen wurde die Wirkung der dreiwertigen Metallionen Eisen (Fe^{3+}) und Aluminium (Al^{3+}) sowie die der zweiwertigen Ionen Kalzium (Ca^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}), Mangan (Mg^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) näher charakterisiert. Wie in der Literatur beschrieben (siehe oben), führte die Anwesenheit der dreiwertigen Ionen Eisen und Aluminium zu einer schnellen, effizienten und dosisabhängigen Förderung der Aggregation von Tau-Oligomeren (vgl. Abschnitt 3.2.3). Unter Tris-Pufferbedingungen wurde eine deutliche Aggregationsinduktion für Aluminiumionen ab 3 μM und für Eisenionen ab 1 μM gefunden (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 3.2.3). Hierbei war interessant, dass Eisenionen zu einer Verschiebung der Aggregate in die rote Fluoreszenz führten, obwohl der Anteil an Alexa488 und Alexa647 markiertem Tau-Protein in gleichem Verhältnis in der Probe vorhanden war. Dies demonstrierte die entsprechende Partikelkonzentration und -helligkeit im grünen und roten Kanal in Vorversuchen zu jedem Versuch (Daten nicht gezeigt). Ebenso zeigten Kontrollexperimente, dass alle Komponenten des Versuches, inklusive dem 10 μM Fe^{3+} , keine Auto-Fluoreszenz aufwiesen [10, 98]. Für die anderen untersuchten Metallionen (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) wurde kein proaggregatorischer Effekt auf das Aggregationsverhalten von Tau-Proteinen beobachtet (vgl. Abschnitt 3.2.3). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass mit Hilfe einzelnmolekülspektroskopischer Verfahren Aluminiumionen und Eisenionen auch in physiologischen Konzentrationen die Tau-Pathologie *in vitro* effizient beeinflussen.

Neben dem Verhalten von Metallionen in Bezug auf die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen rückt eine weitere Hypothese die Bildung oligomerer Tau-Aggregate in das Zentrum des Interesses. Es wird postuliert, dass nicht die Amyloidfibrillen oder die großen lichtmikroskopisch darstellbaren Einschlusskörperchen in Neuronen bzw. Gliazellen die eigentlich toxische Aggregatspezies ausmachen, sondern die kleinen oligomeren Zwischenstufen [46, 77, 89, 134, 235]. Aus diesem Grund ist nicht nur das Endprodukt des Aggregationsprozesses, also die amyloide Fibrille, Forschungsgegenstand dieser Dissertation, sondern auch die Formation und der Aufbau intermediärer Tau-Oligomere. So stellte sich an dieser Stelle die Frage nach der Architektur der unter verschiedenen Milieubedingungen aus Tau-Monomeren gebildeten oligomeren Aggregate.

Für die Versuchsreihe zur Dynamik oligomerer Aggregate wurde in einem vorbereitenden Ansatz ein Aggregationsprozess angeregt, in dem aus entweder Alexa488 oder Alexa647

fluoreszenzmarkierten Tau-Monomeren jeweils oligomere Tau-Intermediate entstanden. Diese „präformierten“ Oligomere wurden mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie auf ihre Stabilität geprüft. Folgende theoretische Überlegungen ließen eine Unterscheidung zwischen einem stabilen Zustand oder einem dynamischen *steady state* zu:

- Wäre die Formation von Tau-Oligomeren aus Monomeren ein Ereignis, aus dem ein stabiler Zustand der Aggregate resultiert, könnten diese Oligomeren ohne einen weiteren Zusatz (z. B. Lösungsmittel oder Induktor) ihre Struktur nicht mehr verändern. In den 2D-Intensitätshistogrammen würden die so entstandenen Punktwolken einem gleich bleibenden Bild entsprechen. Die grün oder rot fluoreszierenden Tau-Proteine (Monomere und Oligomere) würden sich nicht miteinander vermischen, wodurch sich auch über die Zeit keine zweifarbigen Aggregate entwickeln könnten. Somit wären hochintense Fluoreszenzpeaks über den festgelegten Zeitraum nur separat im roten oder im grünen Kanal detektierbar.
- Wären die Oligomere in einem dynamischen *steady state*, könnten in den 2D-Intensitätshistogrammen variable Punktwolken detektiert werden. Die im Vorfeld induzierte Oligomerbildung und die dadurch entstandenen jeweils homogen rot oder grün fluoreszierenden Tau-Aggregate würden sich über einen festgelegten Messzeitraum verändern. Hier würde eine Durchmischung der beiden unterschiedlich fluoreszierenden Tau-Proteine stattfinden. Somit wären mittels einzelmolekülspektroskopischer Verfahren heterogene Aggregate detektierbar.

Solch ein dynamischer *steady state* könnte auf unterschiedlichen Wegen ablaufen:

- Zum einen könnte eine Durchmischung der Proteine durch eine Beschleunigung des An- und Ablagerungsgleichgewichtes von Monomeren oder kleinen Oligomeren stattfinden (engl. *ON/OFF-rate*). Rot bzw. grün fluoreszenzmarkierte Monomere würden sich aus den präformierten einfarbigen Aggregaten lösen, durch die Probe diffundieren und sich, ebenso wie andere noch ungebundene Monomere, unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung an Monomere und/oder Oligomere anlagern. In den 2D-Intensitätshistogrammen würden sich über die Zeit langsam zweifarbige Aggregate entwickeln.
- Eine weitere Möglichkeit eines dynamischen *steady state* bestünde darin, dass sich präformierte Aggregate aneinander anlagern könnten. Die Umstrukturierung der Oligomere würde nicht über einen Monomerpool erfolgen, sondern durch eine direkte Interaktion der vorbestehenden Aggregate. Mit den 2D-Intensitätshistogrammen wären sehr schnell zweifarbige große Aggregate detektierbar.

Um diese Überlegungen zu validieren, wurden die Daten mit Hilfe einer SIFT Analyse ausgewertet, die eine Unterscheidung zwischen einfarbigen und zweifarbigen Oligomeren

in Abhängigkeit von der Zeit ermöglicht. Ein weiterer interessanter Aspekt der Untersuchung war die Betrachtung der Größe von Oligomeren in Abhängigkeit vom Umgebungsmilieu. Die Größe von gemischtfarbigen Aggregaten errechnet sich mit Hilfe eines zweikomponenten FIDA Fit, indem die Partikelhelligkeit der hochintensen Aggregate durch die Partikelhelligkeit der Monomere im grünen und im roten Kanal dividiert wird. So ergibt sich, aus wie vielen Monomeren ein Multimer besteht (Abb. 3.13).

Mit Hilfe dieser Vorüberlegungen und der gewonnenen Ergebnisse (vgl. Abschnitt 3.2.4) wurde gezeigt, dass Tau-Oligomere stabile Aggregate waren. Die „präformierten“ einfarbigen Tau-Oligomere behielten über einen Messzeitraum von 4 Stunden ihre Aggregat-Formation nahezu bei. Das Auftreten neu entstandener zweifarbigiger Aggregate war niedrig und betrug ungefähr 25 % der gesamten Aggregate (Abb. 3.12). In den 2D-Intensitäts-histogrammen waren kaum zweifarbigige Aggregate detektierbar (Abb. 3.10). Die Größe der Aggregate blieb im zweikomponenten FIDA Fit stabil und lag durchschnittlich bei 63 Monomeren pro Oligomer (Abb. 3.13). Ist der Aggregationsprozess einmal initiiert, scheint die Formation von Tau-Oligomeren einen stabilen Zustand zu erreichen, der durch eine sehr niedrige intrinsische Umsatzrate gekennzeichnet ist.

Diese Ergebnisse ließen sich in der Versuchsreihe mit Tau-Fibrillen weiter beobachten (vgl. Abschnitt 3.3.4 und 4.5.2). Präformierte Tau-Oligomere (mit DMSO vorinkubiert) lagerten sich nicht an präexistente Tau-Fibrillen an. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Tau-Oligomere stabile Aggregate sind. Sie stellen vielleicht den ersten Schritt in der Fibrillenbildung dar, wobei sie sich anscheinend nicht durch Assoziation von Aggregaten, sondern durch stetiges Wachstum vergrößern. Jedoch können wir in diesem Stadium der Forschung nur darüber spekulieren, inwiefern diese Oligomere zur Tau-Pathologie beitragen und ob sie eine frühe Entwicklungsstufe auf dem Weg zu den großen Amyloidfibrillen darstellen.

Wurde dem Versuchsansatz nach 4 Stunden NP40 zugefügt, waren die präformierten vormals stabilen einfarbigen Oligomere einer Veränderung unterworfen. Es bildeten sich zweifarbigige Aggregate aus (vgl. Abschnitt 3.2.4), deren Anzahl über die Zeit langsam anstieg und ein stabiles Maximum von 60 - 70 % zweifarbigiger Aggregate an den gesamten Oligomeren erreichte (Abb. 3.12). Diese Zahl deutet darauf hin, dass ohne NP40 nur ein unvollständiger Umsatz der Tau-Oligomere stattfand. An dieser Stelle kann im Weiteren diskutiert werden, ob Tau-Oligomere, die sich in einer perimembranösen Umgebung formen, eine niedrigere Beständigkeit gegenüber destabilisierenden Faktoren aufzeigen und dadurch einen erhöhten Umsatz haben. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass für Tau-Oligomere, deren Bildung durch das Lösungsmittel NP40 und nicht durch DMSO induziert wurde, eine effiziente Interaktion mit Tau-Fibrillen detektierbar war. Ebenso gingen Tau-Monomere in Gegenwart von NP40 eine effiziente Bindung mit Tau-Fibrillen ein (vgl. Abschnitt 3.3.4). Des Weiteren betrug die Durchschnittsgröße der durch DMSO induzierten Aggregate 63 Monomere pro Oligomer, während Oligomere,

die sich nach dem Zusatz von NP40 bildeten, kleiner waren und nur aus durchschnittlich 34 Monomeren pro Oligomer aufgebaut waren (Abb. 3.13). Wir erklären diese Tatsachen dadurch, dass NP40 über die Auflösung von einfarbigen Aggregaten, d. h. über einen Monomerpool, zu einer Beschleunigung der *ON/OFF-rate* führte, da sich zweifarbige helle Aggregate langsam über die Zeit bildeten.

Die Gegenwart von Aluminiumionen in diesem Ansatz induzierte eine rasche Interaktion von sowohl Tau-Monomeren als auch Tau-Oligomeren (vgl. Abschnitt 3.2.4). Mit der SIFT Analyse wurde gezeigt, dass über die Zeit nahezu 100% der Aggregate zu zweifarbigen Oligomeren aggregierten, auch wenn präformierte einfarbige, durch DMSO induzierte Oligomere vor dem Hinzufügen von Aluminiumionen vorhanden waren (Abb. 3.12). Diese durch Aluminium induzierten Aggregate erreichten mehr als die vierfache Helligkeit der durch DMSO gebildeten Aggregate. Die Durchschnittsgröße lag bei ungefähr 370 Monomeren pro Oligomer (Abb. 3.13). Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass eine schnelle Interaktion bzw. Assoziation der präformierten Oligomere zu größeren Aggregaten statt fand. Hier war ein extrem schneller Prozess erkennbar, verglichen mit den Veränderungen, die durch NP40 induziert wurden. An dieser Stelle ist zu überlegen, ob oben beschriebene Effekte auf die sonst stabilen Oligomere auf die komplexierenden Eigenschaften der dreiwertigen Ionen Aluminium und Eisen zurückzuführen sind.

4.5 Die Koaggregation von Tau-Protein und α -Synuklein

Tauopathien und Synukleinopathien wurden in früheren Studien als komplett separate Entitäten angesehen [92, 219]. Es gibt in der neueren Literatur Nachweise, dass Einschlüsse von sowohl Tau-Protein als auch α -Synuklein überzufällig häufig gemeinsam im histopathologischen Befund von neurodegenerativen Erkrankungen vorkommen. So zeigt zum Beispiel die Demenz mit Lewy-Körperchen eine gemischte Pathologie auf, bei der sowohl α -Synuklein-positive Lewy-Körperchen [162] als auch Alzheimer-typische Veränderungen im Sinne von Tau-positiven Neurofibrillen und Amyloid-Plaques zur Darstellung kommen [173]. Beide Läsionen können zuweilen sogar in derselben Zelle detektiert werden, wobei die Tau- und α -Synuklein-Fibrillen bisweilen sogar den Anschein haben, miteinander verflochten zu sein [104, 144, 159, 200]. Eine α -Synuklein- und Tau-Pathologie wird öfters gemeinsam in Gehirnen von Patienten mit familiärer Alzheimer Erkrankung [143], Down-Syndrom [144] und dem Parkinson-Demenz-Komplex von Guam [54, 239] immunhistochemisch nachgewiesen. Eine direkte Verbindung zwischen der Aggregation von Tau-Protein und α -Synuklein konnte bei Verwandten der Contursi Familie, die eine Ala53Thr- α -Synuklein-Mutation aufweisen, gezeigt werden, bei denen *post mortem* ausgedehnte α -Synuklein- und Tau-Einschlüsse detektiert wurden [48, 69] (vgl. Abschnitt 1.4).

Es stellt sich hier in Bezug auf die molekulare Grundlage die Frage, wodurch die Koinzidenz beider Proteine in diesen Erkrankungen unterstützt wird. Begünstigt der zugrunde liegende Krankheitsprozess die Entwicklung von Aggregaten beider Proteine oder fördern Tau-Protein und α -Synuklein sich in ihrer Aggregation gegenseitig?

Um näheren Einblick zu gewinnen, wie α -Synuklein und Tau-Protein miteinander interagieren und um den Effekt zu untersuchen, den dies auf das Aggregationsverhalten von Oligomeren und die Polymerisation der Proteine in Fibrillen hat, wurde im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie ein *in vitro* Ansatz entwickelt, um die molekularen Grundlagen der Koaggregation von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillenebene zu studieren (vgl. Abschnitt 2.10.4, 2.10.5 und 4.3).

4.5.1 Das Koaggregationsverhalten auf Oligomerebene

Tau-Protein und α -Synuklein verhalten sich in ihren aggregatorischen Eigenschaften nicht gleich. In Gegenwart von Detergenzien und Lösungsmitteln reagieren sie unterschiedlich. Sie weisen jedoch auch Gemeinsamkeiten auf. Mit der verwendeten Methode wurden Eigenschaften nachgewiesen, die abhängig vom und spezifisch für das jeweilige Protein waren. Diese Eigenschaften wiederum konnten durch Veränderungen des Umgebungsmilieus modifiziert werden. Auf diese Weise wurden Bedingungen geschaffen, unter denen die Darstellung der Aggregation beider Proteine zu oligomeren Aggregaten gelang (vgl. Abschnitt 3.2). Dies schuf Voraussetzungen für einen Ansatz, mit dem Koaggregationsprozesse zwischen Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillenebene effizient untersucht werden konnten.

Mit Hilfe folgender theoretischer Überlegungen ließ sich eine Aussage über das Koaggregationsverhalten treffen:

- Fände Koaggregation zwischen den zwei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Komponenten statt, würden zweifarbig fluoreszierende Aggregate detektierbar, deren Intensität des Fluoreszenzsignals für beide Kanälen ähnlich hoch wäre.
- Fände keine Koaggregation statt, aber eine Förderung der Aggregation der jeweiligen Komponente, könnten Aggregate im jeweiligen Kanal des fluoreszierenden Proteins detektiert werden.
- Würde keine Aggregatbildung induziert oder diese sogar gehemmt, ließe sich kein Aggregatsignal messen.

Die gemeinsame Untersuchung von Tau-Protein und α -Synuklein in einem Ansatz führte zu einer effizienten Koaggregation der beiden Proteine. Dies zeigte sich dadurch, dass

die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Komponenten gemischtfarbige heterogene Aggregate ausbildeten, die für beide Kanäle eine ähnlich hohe Intensität ihres Fluoreszenzsignals emittierten. Eine Veränderung der Milieubedingungen durch das Lösungsmittel DMSO oder den Alkohol Ethanol induzierte ein gesteigertes Koaggregationsverhalten. Die Anwesenheit des Tensids NP40 hingegen hemmte die Aggregation von α -Synuklein und unterband somit die Bildung von Koaggregaten, wohingegen Tau-Proteine helle Aggregate ausbildeten (vgl. Abschnitt 3.2.5).

Nachdem mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie gezeigt wurde, dass *in vitro* eine Koaggregation zwischen Tau-Protein und α -Synuklein grundsätzlich möglich war, stellte sich in der Folge die Frage, wie diese Koaggregate aufgebaut sind. Um eine Vorstellung von der Architektur der oligomeren Koaggregate zu erhalten, wurde die FRET Analyse (vgl. Abschnitt 2.11.3, 3.2.6 und 4.2) verwendet, mit der über die Anordnung der Proteine im Oligomer weiter Aufschluss gewonnen wurde.

Die Methode des FRET beschreibt einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer. Sie ist ein physikalischer Prozess, bei dem die Energie eines angeregten fluoreszierenden Farbstoffes (Donor-Fluorophor) ohne Strahlung auf einen zweiten fluoreszierenden Akzeptor (Akzeptor-Fluorophor) übertragen wird, in Abhängigkeit von der Entfernung der beiden Fluorophore zueinander. Somit kann durch die Intensität des FRET eine Vorstellung vom Aufbau von Oligomeren gewonnen werden (vgl. Abschnitt 2.11.3).

Die Abbildung 4.1 zeigt den theoretischen Grundgedanken dieses Versuches. Es wurde davon ausgegangen, dass es drei Möglichkeiten gibt, die mit Hilfe der FRET Analyse differenziert werden können:

- A)** Einerseits könnten zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Proteine (grün oder rot) jeweils homogen mit sich selbst aggregieren. Dies würde in der Anregung mit zwei Lasern sowohl grüne als auch rote Oligomere zeigen, jedoch keine zweifarbigen. In der FRET-Messung, also der Anregung nur mit dem Laser der Wellenlänge 488 nm, wären nur grüne Aggregate zu detektieren, da kein Energietransfer von den grünen auf die roten Fluoreszenzfarbstoffe stattfinden würde, da diese zu weit entfernt voneinander bzw. nicht im gleichen Aggregat lokalisiert wären (Abb. 4.1-A).
- B)** Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass die jeweiligen Proteine zwar miteinander aggregieren könnten, aber weitere Monomere sich bevorzugt an das gleiche Protein anlagern würden. Das heißt, Koaggregate würden sich zwar bilden, aber innerhalb eines Aggregats entstünde eine homogene Ordnung nach dem jeweiligen Protein. Diese Formation würde in der Messung mit zwei Lasern zweifarbige Koaggregate mit gleichzeitig hoher Fluoreszenzintensität in beiden Kanälen zeigen. In der FRET-Messung jedoch würden sich nur grüne Aggregate zeigen, da keine Energieübertragung von den grünen auf die roten Fluoreszenzfarbstoffe stattfinden

könnte. Der Großteil der grün fluoreszierenden Proteine wäre im Aggregat zu weit entfernt von den rot fluoreszierenden Molekülen angeordnet (Abb. 4.1-B).

- C) Die dritte Möglichkeit bestünde darin, dass die unterschiedlich fluoreszierenden Proteine gemischt miteinander koaggregieren würden. Hier würde die zweifarbige Laser-Messung zweifarbige Oligomere ergeben. In der FRET-Messung könnten nun Aggregate detektiert werden, die sowohl grüne, als auch rote Fluoreszenz emittierten. Diese Möglichkeit würde zeigen, dass die unterschiedlich fluoreszierenden Proteine nur wenige Nanometer voneinander entfernt im Aggregat lokalisiert wären und somit ein Energietransfer von den grünen auf die roten Fluoreszenzfarbstoffe stattfinden könnte (Abb. 4.1-C).

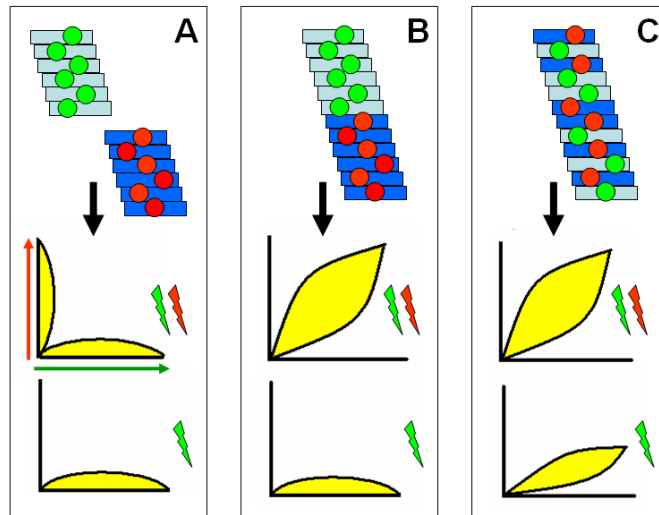


Abb. 4.1: Theoretischer Grundgedanke zur Architektur von Koaggregaten. Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Formation von Koaggregaten und der Messmöglichkeit mit Hilfe der FRET Analyse.

Wurden die Koaggregate, die aus Tau-Proteinen und α -Synukleinen entstanden, mit einer FRET-Messung untersucht, d.h. nur mit dem grünen Laser angeregt, wurde sowohl grüne als auch rote Fluoreszenz detektiert (vgl. Abschnitt 3.2.6 und Abbildung 3.16). Dies ließ darauf schließen, dass ein Energietransfer von den grün fluoreszierenden Farbstoffen auf die rot fluoreszierenden Farbstoffe statt fand. Somit konnte, den obigen Überlegungen folgend, davon ausgegangen werden, dass die fluoreszenzmarkierten Tau-Proteine und α -Synukleine im Koaggregat nur wenige Nanometer voneinander entfernt im Koaggregat positioniert waren, und zwar in einer gemischten Gruppierung aus rot und grün markierten Proteinen (vgl. Abbildung 4.1-C).

In der „FRET-Messung“ wurde für die reinen Tau-Protein- oder α -Synuklein-Ansätze ebenfalls ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer gezeigt. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass das Verhältnis der markierten Proteine zueinander ausgewogen war und diese unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung miteinander aggregierten (vgl. Abschnitt 3.2.6 und Abbildung 3.16).

4.5.2 Das Koaggregationsverhalten auf Fibrillenebene

Amyloidfibrillen unterschiedlicher Erkrankungen könnten sich einen gemeinsamen Pfad für die Fibrillenformation teilen. Das auslösende Ereignis scheint die Missfaltung der Proteine oder ihre Denaturierung zu sein. Proteinaggregate, die sich von Dimeren bis zu Partikeln von mehr als einer Million Dalton erstrecken, wurden mit einer Varietät von Methoden beobachtet [26, 66, 91, 95, 214, 231]. So konnten lösliche kugelförmige Aggregate von ungefähr 3 - 10 nm für unterschiedliche Typen von Amyloiden unter anderem mit der Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie gezeigt werden [4, 91, 133]. Nach längerer Aggregationszeit formen sich gekrümmte Fasern, die ein perlschnurartiges Aussehen haben. Diese Strukturen wurden auch „Protofibrillen“ genannt, weil sie durch die Vereinigung der kugelförmigen Untereinheiten zu entstehen scheinen [23, 91, 132, 147, 214, 231]. Schlussendlich fördern diese Strukturen entweder die Konformationsänderung oder sie erleben selbst eine, um reife 6 - 10 nm große β -Faltblatt Fibrillen zu bilden [91].

Tau-Protein benötigt für seine Aggregation zu Fibrillen *in vitro* Kofaktoren, z.B. Polyanionen wie Nucleinsäuren oder Glycosaminoglycane [13, 62, 81, 104, 117, 144, 172, 181]. So wurde auch in dieser Arbeit das Polysaccharid Heparin für die Herstellung von Tau-Fibrillen als Induktor der Fibrillisation verwendet (vgl. Abschnitt 2.7.1, 3.3.1 und [87, 181]). α -Synuklein hingegen polymerisiert *in vitro* bereitwillig selbst [33, 71, 142, 159, 200, 227, 237]. So wurde α -Synuklein für die Versuche dieser Dissertation ohne Zusatz eines Induktors zur Fibrillisation gebracht (vgl. Abschnitt 2.7.2 und 3.3.1). Dies steht vielleicht im Gegensatz dazu, dass Tau-Monomere unter Pufferbedingungen zu Oligomeren aggregieren, während jedoch α -Synuklein die Anwesenheit von DMSO oder Ethanol benötigt, um oligomere Aggregate ausbilden zu können (vgl. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Bedeutenderweise konnte gezeigt werden, dass α -Synuklein oben genannte Polyanionen ersetzen kann, indem es *in vitro* die Polymerisation von Tau-Protein zu Fibrillen initiiert [69]. Zudem fördern Tau-Protein und α -Synuklein synergistisch ihre Aggregation zu Fibrillen, sobald die Tau-Fibrillisation einmal initiiert war. Hier erhöht auch Tau-Protein bedeutend die Aggregation von α -Synuklein-Fibrillen aus α -Synuklein-Monomer, das in niedrigen Konzentrationen nur schwer Fibrillen bilden kann [69, 138].

Mit der Elektronenmikroskopie und den Thioflavin T Fluoreszenzeigenschaften wurde die Formation amyloider Aggregate verifiziert (vgl. Abschnitt 2.7, 2.8, 2.9 und 3.3.1) und diese präexistenten Fibrillen anschließend für die Experimente der vorliegenden Dissertation verwendet. Der Ansatz ermöglichte es, mittels einzelmolekülbasierter Ver-

fahren weitere Informationen über das Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein sowohl im homologen (Tau-Tau, Syn-Syn) (vgl. Abschnitt 3.3.4 und 3.3.3) als auch im heterologen System (Tau-Syn, Syn-Tau) (vgl. Abschnitt 3.3.5) zu erlangen. Die Methode erlaubte, innerhalb des zweifarbigen Messaufbaus eine Unterscheidung zwischen Monomeren, präformierten oligomeren Intermediaten und präexistenten Fibrillen zu treffen. Auf diese Weise konnten differenzierte Aussagen zum Aggregationsverhalten auf diesen unterschiedlichen Ebenen innerhalb variierbarer Milieubedingungen getroffen werden (vgl. Abschnitt 3.3).

Erwähnenswert ist die Beobachtung, dass im homologen System Monomere nur in Gegenwart des Aggregationsinduktors DMSO mit den Fibrillen zu größeren Aggregaten führten. Wohingegen durch DMSO induzierte Oligomere im homologen System nicht effizient mit den Fibrillen interagierten. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass oligomere Aggregate in ihrer Konformation stabiler waren und deshalb im Gegensatz zu Monomeren keine Interaktion mit Fibrillen eingehen konnten (vgl. Abschnitt 3.2.4 und 4.4). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nach induzierter Oligomerisierung diese Aggregate ohne weitere Aggregationsinduktoren, wie z. B. die Metallionen Aluminium und Eisen, nicht mehr miteinander zu größeren Aggregaten assoziieren konnten, sondern sich entsprechend des stufenartigen Aggregationsprozesses (vgl. Abschnitt 1.1 und [196, 234]) vielmehr weiter zu amyloiden Aggregaten entwickelten.

Im heterologen System zeigte sich das Koaggregationsverhalten in anderer Weise. Hier spielten vor allem die von den Milieubedingungen abhängigen proteinspezifischen Eigenschaften eine Rolle. So koaggregierten α -Synuklein-Monomere unter Pufferbedingungen und in Gegenwart von NP40 nicht mit den Tau-Fibrillen, während Tau-Monomere und -Oligomere sehr koaggregationsfreudig mit den α -Synuklein-Fibrillen interagierten. Die mit DMSO vorinkubierten oligomeren Aggregate bildeten im heterologen System, im Gegensatz zum homologen System, mit den Fibrillen zweifarbige Koaggregate aus (vgl. Abschnitt 3.3.5).

Wurden die Milieubedingungen dieser Versuche durch das Hinzufügen der dreiwertigen Metallionen Eisen und Aluminium variiert, so war eine starke Förderung der Aggregation sowohl im homologen als auch im heterologen System detektierbar. Die Bildung großer zweifarbiger Aggregate war unabhängig von den zuvor bestehenden Milieueigenschaften. Sogar in Anwesenheit von NP40, das eigentlich die Aggregation und Koaggregation von α -Synuklein unterband (vgl. Abschnitt 3.2.2), war die Wirkung der Metallionen stärker (vgl. Abschnitt 3.3.6 und 3.3.7).

5 Zusammenfassung

Bei allen neurodegenerativen Erkrankungen findet sich als wesentliches Merkmal die pathologische Aggregation und Ablagerung bestimmter krankheitstypischer Proteine. So finden sich z. B. Tau-Protein-Aggregate beim M. Alzheimer und α -Synuklein-Aggregate beim M. Parkinson. Es wird davon ausgegangen, dass die neurotoxischen Effekte pathologischer Proteinaggregate insbesondere durch kleine oligomere Aggregate vermittelt werden. Was genau die neurotoxischen Eigenschaften ausmacht, ist jedoch unklar. Ebenso ist weitgehend ungeklärt, wodurch die pathologische Aggregation initiiert, gefördert oder gehemmt wird.

Das Ziel meiner Arbeit war, die molekularen Prozesse der Proteinaggregation bei Tauopathien und Synukleinopathien näher zu analysieren. Hierbei wurden methodisch unter anderem Proteinexpression, Fluoreszenzmarkierung, Gelelektrophorese, Westernblot, verschiedene Assays zur Proteinbestimmung, Herstellung von Proteinfibrillen, Thioflavin T Fluoreszenz und Elektronenmikroskopie verwendet. Die Aggregationsprozesse wurden insbesondere mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie untersucht und die Messdaten mittels Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen (SIFT), Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse (FIDA) und Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) analysiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Milieufaktoren auf die Aggregation von Tau-Protein untersucht. Dreiwertige Eisenionen (ab 1 μ M) und Aluminiumionen (ab 3 μ M) führten zu einer schnellen und dosisabhängigen *de novo* Aggregation, wohingegen die zweiwertigen Ionen Kalzium, Kupfer, Magnesium, Mangan und Zink keine signifikante Wirkung zeigten. Um die Dynamik intermediärer Tau-Oligomere näher betrachten zu können, wurden separat präformierte Alexa488- und Alexa647-markierte Tau-Oligomere gemeinsam untersucht. Sie stellten sich als stabile Aggregate dar, die intrinsische Umsatzrate war niedrig. Auch interagierten diese präformierten Tau-Oligomere nicht mit präexistenten Tau-Fibrillen, wohingegen Tau-Monomere mit Tau-Fibrillen in Gegenwart von DMSO zahlreiche zweifarbige Aggregate ausbilden konnten. Nach dem Hinzufügen von NP40 stellte sich ein langsamer, konstanter Anstieg der zweifarbigen Aggregate bis zu einem stabilen Gleichgewicht von 60 - 70 % der Gesamtaggregate ein, deren Durchschnittsgröße bei 34 Monomeren pro Oligomer lag. Auch Tau-Monomer und -Oligomer konnten in Gegenwart von NP40 mit Tau-Fibrillen eine effiziente Bindung eingehen. Durch Aluminium bildeten sich schnell zweifarbige Aggregate, deren Anteil an Gesamtaggregate über die Zeit bei nahezu 100 % lag. Ihre Durchschnittsgröße betrug

370 Monomeren pro Oligomer. Es ist anzunehmen, dass NP40 über einen Monomerpool die *ON/OFF-rate* beschleunigt, wohingegen Aluminiumionen zu einer schnellen Assoziation der vorhandenen Monomere und präformierten Oligomere führt.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Koaggregation von Tau-Protein und α -Synuklein. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass Koaggregation zwischen Tau-Protein und α -Synuklein statt fand. Um Näheres über die Architektur dieser Koaggregate zu erfahren, wurden FRET Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse legen nahe, dass Tau-Proteine und α -Synukleine im Koaggregat nur wenige Nanometer voneinander entfernt positioniert sind in einer gemischten Anordnung aus unterschiedlich fluoreszierenden Proteinen. Auf Fibrillenebene koaggregierten α -Synuklein-Monomere unter Standard-Pufferbedingungen und in Gegenwart von NP40 nicht mit Tau-Fibrillen. Tau-Monomere und -Oligomere waren jedoch sehr koaggregationsfreudig mit den α -Synuklein-Fibrillen. Wurden die Milieubedingungen dieser Versuche durch die dreiwertigen Metallionen Eisen und Aluminium variiert, war eine starke Förderung der Aggregation sowohl im homologen als auch im heterologen System detektierbar.

Das entwickelte experimentelle Modellsystem ermöglichte es, zahlreiche Informationen über die pathologischen Aggregationsprozesse bei Tauopathien und Synukleinopathien und die Koaggregation dieser beiden Proteine auf Einzelmolekülebene zu gewinnen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass unterschiedliche Veränderungen des Umgebungsmilieus den Aggregationsprozess von Tau-Protein auf den verschiedenen Aggregations-Ebenen (Monomer, Oligomer, Fibrille) in jeweils unterschiedlicher Weise verändert. *In vitro* konnte insbesondere gezeigt werden, dass Aggregationsprozesse von Tau-Protein auf Oligomerebene stark von den Metallionen Eisen und Aluminium beeinflusst werden. An dieser Stelle ist zu überlegen, ob Metallionenchelatoren als therapeutische Maßnahme den Krankheitsprozess *in vivo* positiv beeinflussen können. Darüber hinaus können potentielle Ansätze für therapeutische Substanzen dargestellt werden, die direkt die pathologischen Oligomerprozesse beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit einen weiteren Baustein für die Grundlagenforschung zur molekularen Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen, mit dem langfristigen Ziel der Entwicklung von Medikamenten, damit Erkrankungen wie M. Parkinson oder M. Alzheimer in Zukunft erfolgreich kausal therapiert werden können.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	(= engl. <i>Alzheimer's disease</i>) Morbus Alzheimer
AGD	(= engl. <i>argyrophilic grain disease</i>) Silberkornkrankheit
BSA	Bovines Serumalbumin
CBD	(= engl. <i>corticobasal degeneration</i>) Kortikobasale Degeneration
CPP	(= engl. <i>counts per particle</i>) Mittlere Helligkeit der Partikel
DLB	(= engl. <i>dementia with Lewy bodies</i>) Lewy-Körperchen Demenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
FCS	(= engl. <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>) Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FIDA	(= engl. <i>fluorescence intensity distribution analysis</i>) Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse
FTD	Frontotemporale Demenz
FTDP-17	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus in Verbindung mit Chromosom 17
FTLD	(= engl. <i>frontotemporal lobar degeneration</i>) Frontotemporale Lobärdegeneration
FTLD-MAPT	Familiäre frontotemporale Lobärdegeneration mit Mutationen im MAPT-Gen
FTLD-U	Frontotemporale Lobärdegeneration mit Ubiquitin positiven Einschlüssen
FTLD-PGRN	Familiäre frontotemporale Lobärdegeneration mit Mutationen im Progranulin-Gen
FUS	(= engl. <i>fused in sarcoma</i>)
FRET	(= engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>) Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
HE	Hämatoxilin-Eosin Färbung
Itot	Gesamthelligkeit
kDa	Kilo-Dalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
MAPT	(= engl. <i>microtubule associated protein Tau</i>) Mikrotubuli assoziiertes Protein Tau
MND	(= engl. <i>motor neuron disease</i>)

MSA	(=engl. <i>multiple system atrophy</i>) Multisystematrophie
N	Partikelzahl
NAC	(= engl. <i>non-Aβ component</i>) Nicht-A β Komponente
NFTs	Neurofibrilläre Tangles
NIFID	(= engl. <i>neuronal intermediate filament inclusion disease</i>) Neuronale Intermediärfilament-Einschlusskörperchen-Krankheit
NP40	Igepal
PD	(= engl. <i>Parkinson's disease</i>) Morbus Parkinson
PGRN	Progranulin
PHFs	(= engl. <i>paired helical filaments</i>) Paarige helikale Filamente
PNS	Peripheres Nervensystem
PrP	Prion-Protein
PSP	(= engl. <i>progressive supranuclear palsy</i>) Progressive supranukleäre Blicklähmung
SFs	(= engl. <i>straight filaments</i>) Gerade Filamente
SIFT	(= engl. <i>scanning for intensely fluorescent targets</i>) Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
VCP	(= engl. <i>valosin-containing protein</i>)
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1	Molekularpathologische Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen (modifiziert nach [177]).	2
1.2	Proteinaggregation. Die Transformation von Monomeren zu Amyloidfibrillen über intermediäre Stufen.	2
1.3	Schematische Darstellung der verschiedenen Stufen der Formation pathologischer Tau-Aggregate [11].	5
2.1	Herstellung von Tau-Fibrillen.	22
2.2	Herstellung von α -Synuklein-Fibrillen.	23
2.3	Schematischer Messaufbau eines Insight Readers mit einem Multiwell-Probenträger (modifiziert nach [73]).	28
2.4	Schematische Darstellung einer Messung, deren zu erfassendes Probenvolumen durch einen mobilen Lasermessfokus vergrößert wird und die Darstellung der so gewonnenen Daten in einem 2D-Intensitätshistogramm. Hier wird die Anzahl an gezählten Photonen pro Bins im roten (y-Achse, max. 250 Photonen) und grünen Kanal (x-Achse, max. 250 Photonen) nach ihrer Intensität auf der jeweiligen Achse, nach ihrer Häufigkeit farbcodiert, dargestellt. Die Bins mit hohen Werten für beide Kanäle repräsentieren zweifarbige, also sowohl Alexa488 als auch Alexa647 markierte Proteinaggregate (modifiziert nach [73]).	31
2.5	SIFT Auswertung eines 2D-Intensitätshistogramms. Die Fläche wird in 18 Segmente unterteilt, wobei ein 19. Segment einer definierten Größe im linken unteren Abschnitt des Histogramms die dunkelsten Partikel aus nicht aggregiertem Protein abgrenzt. In diesem Beispiel zeigt die y-Achse die Zahl der Photonen pro Bins für den roten Kanal bis zu einem Maximalwert von 100 Photonen und die x-Achse die Photonen pro Bins für den grünen Kanal bis zu einem Wert von 80 Photonen. Die Punkte stellen die einzelnen Bins entsprechend ihrer Helligkeit und Farbverteilung auf den Achsen und nach Häufigkeit farbcodiert dar. Hierbei entsprechen Segment 1 - 3 den grün fluoreszierenden Aggregaten, Segment 16 - 18 den rot fluoreszierenden Proteinaggregaten und die Segmente 4 - 15 stehen für die zweifarbig markierten Koaggregate (modifiziert nach [141]).	32
3.1	Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE Gel, digitalisiert (ChemiGenius, Bio Imaging System). Gezeigt sind die Reinigungsschritte der Proteinexpression des Tau-Proteins (Kationenaustauscher, Salzfällung und Denaturierung, PD-10-Säule) und eine BSA-Konzentrationsreihe für die Proteinbestimmung der Tau-Stammlösung.	34

3.2	Das Aggregationsverhalten von Tau-Protein (Alexa488-, Alexa647-markiert). 2D-Intensitätshistogramme visualisieren das Verhalten von Tau-Protein unter verschiedenen Milieubedingungen: Tris-Puffer 50 mM (A), Tris-Puffer und NP40 0,1 % (B), DMSO 1 % (C) oder Ethanol 10 % (D). Die Partikelzahl der Tau-Proteine lag in beiden Kanälen bei ca. 5. Der Maßstabsbalken beschreibt jeweils 255 Photonen pro Bins auf der x- und y-Achse.	35
3.3	Aggregationsverhalten von α -Synuklein (Alexa488-, Alexa647-markiert). 2D-Intensitätshistogramme visualisieren das Verhalten von α -Synuklein unter verschiedenen Milieubedingungen: Tris-Puffer 50 mM (A), Tris-Puffer und NP40 0,1 % (B), DMSO 1 % (C) oder Ethanol 10 % (D). Die Partikelzahl der α -Synukleine lag in beiden Kanälen bei ca. 18. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	36
3.4	Verhalten von Tau-Protein (Alexa488- und Alexa647-markiert) in Anwesenheit von Metallionen: Untersuchung von Fe^{3+} -, Al^{3+} -, Cu^{2+} -, Mn^{2+} -, Ca^{2+} -, Zn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (10 μM) unter verschiedenen Milieubedingungen: Tris-Puffer 50 mM (I.) und Tris-Puffer mit NP40 0,1 % (II.) oder DMSO 1 % (III.). Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2. . . .	37
3.5	Wirkung von Aluminiumionen (Al^{3+}) auf Tau-Protein (Alexa488- bzw. Alexa647-markiert). Konzentrationsreihe der Aluminiumionen von 0,003 - 100 μM in Tris-Puffer 50 mM. Die Partikelzahl der Tau-Proteine in beiden Kanälen lag bei ca. 5. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	38
3.6	Aluminiumionen-Verdünnungsreihe in Tris-Puffer (50 mM). SIFT-Auswertung: Zusammenfassung der Segmente 1 - 6 von 6 aus sechs Einzelmessungen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung eines 4-fach Ansatzes. Ko bezeichnet die Kontrolle. . .	38
3.7	Wirkung von Eisenionen (Fe^{3+}) auf Tau-Protein (Alexa488- bzw. Alexa647-markiert). Konzentrationsreihe der Eisenionen (0,003 - 100 μM) in Tris-Puffer 50 mM. Die Partikelzahl der Tau-Proteine lag in beiden Kanälen bei ca. 5. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	39
3.8	Die Eisenionen-Verdünnungsreihe in Tris-Puffer (50 mM). SIFT Auswertung: Zusammenfassung der Segmente 1 - 6 von 6 aus sechs Einzelmessungen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung eines 4-fach Ansatzes. Ko bezeichnet die Kontrolle. . .	39
3.9	Oligomer Dynamik – Messung des Ausgangswertes. Tau-Proteine wurden jeweils 1,5 Stunden mit DSMO vorinkubiert, um eine Oligomerbildung zu induzieren. Tau-Protein wurde in A) Alexa647 markiert verwendet, in C) Alexa488 markiert und in B) die Ansätze A und B nach seperater Vorinkubation gemischt und dann sofort auf die Messplatte aufgetragen. Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	40
3.10	Oligomer Dynamik – Messung über die Zeit. Beobachtung des Verhaltens präformierter Tau-Aggregate über einen Zeitraum von 240 Minuten. Die Partikelzahl betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	41

3.11	Oligomer Dynamik nach Zugabe von NP40 und Aluminiumionen. Beobachtung des Verhaltens präexistenter Tau-Aggregate über einen Zeitraum von 120 Minuten (im Anschluss an die 240 Minuten Messung) in Gegenwart von NP40 0,1 % oder Aluminium 10 μ M. Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	42
3.12	Darstellung der Bildung von zweifarbigen Aggregaten über die Zeit. Der Anteil von zweifarbigen Aggregaten an den Gesamtaggregate war bei ca. 25 % über einen Zeitraum von 240 Minuten konstant (erste Messung). Nach Zugabe von NP40 0,1 % stellte sich nach 30 - 60 Minuten ein Gleichgewicht bei ca. 60 - 70 % zweifarbiger Oligomere an den Gesamtaggregate ein, während Aluminiumionen 10 μ M dazu führten, dass nahezu 100 % der Aggregate zweifarbige Oligomere wurden (zweite Messung über 2 Stunden).	43
3.13	Darstellung der Partikelhelligkeit über die Zeit. Die Größe der präformierten (DMSO) Aggregate war in einem zweikomponenten FIDA Fit bei durchschnittlich 63 Monomeren pro Oligomer stabil. Aggregate, die sich nach Zugabe von NP40 0,1 % bildeten, waren mit durchschnittlich 34 Monomeren pro Oligomer kleiner, während durch Aluminium 10 μ M induzierte Aggregate mehr als die vierfache Helligkeit der durch DMSO gebildeten Aggregate erreichten und eine Durchschnittsgröße von ca. 370 Monomeren pro Oligomer aufzeigten.	44
3.14	Schematische Darstellung der Kombinationsmöglichkeiten des Alexa488- bzw. Alexa647-markierten α -Synuklein und Tau-Protein.	44
3.15	Koaggregationsversuch von Tau-Protein und α -Synuklein. Die 2D-Intensitätshistogramme repräsentieren das Koaggregationsverhalten von Tau-Protein und α -Synuklein in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % oder Ethanol 10 % und jeweils parallele Ansätze unter Zugabe von NP40 0,1 %. Die Partikelzahl der Tau-Proteine in beiden Kanälen betrug ca. 4. Die Partikelzahl der α -Synukleine betrug in beiden Kanälen ca. 35. Im Koaggregationsansatz war das Verhältnis der Partikelzahl von Tau-Protein und α -Synuklein ca. 1 zu 10. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	45
3.16	Koaggregationsversuch mit FRET Analyse. Die 2D-Intensitätshistogramme repräsentieren das Aggregationsverhalten von α -Synuklein und Tau-Protein in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit NP40 0,1 %, DMSO 1 % oder Ethanol (5 %, 10 %, 20 %). Die Partikelzahl der Tau-Proteine betrug in beiden Kanälen ca. 5 (I.). Die Partikelzahl der α -Synukleine betrug in beiden Kanälen ca. 18 (II.). In den Koaggregationsansätzen war das Verhältnis der Partikelzahl von Tau-Protein und α -Synuklein ca. 1 zu 4 (III., IV.). Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	47
3.17	Darstellung von Tau-Fibrillen (siehe Abschnitt 2.7.1) mit der Thioflavin T Bindungsreaktion. Der Graph entspricht der Messung der Tau-Fibrillen am Tag 3 nach der Inkubation (rote Kurve). Die blaue Kurve dient als Kontrolle.	48
3.18	Tau-Fibrillen visualisiert im TEM. A) 31.500-fach vergrößert, B) 20.000-fach vergrößert. Der Maßstabsbalken beschreibt 200 nm. Die Fibrillen wurden mit 2 % Uranylacetatlösung gefärbt, auf ein karbonisiertes Kupfernetz aufgetragen und anschließend im TEM visualisiert.	49

3.19	Darstellung von α -Synuklein-Fibrillen (vgl. Abschnitt 2.7.2) mit der Thioflavin T Bindungsreaktion. Der Graph entspricht der Messung der α -Synuklein-Fibrillen am Tag 49 nach Inkubation (rote Kurve). Die blaue Kurve dient als Kontrolle.	49
3.20	α -Synuklein-Fibrillen im TEM. A) 16.500-fach vergrößert, B) 40.000-fach vergrößert. Der Maßstabsbalken beschreibt 200 nm. Die Fibrillen wurden mit 2 % Uranylacetatlösung gefärbt, auf ein karbonisiertes Kupfernetz aufgetragen und anschließend im TEM visualisiert.	50
3.21	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es wurden sowohl Monomere (ohne (I.) oder mit (III.) DMSO 1 %) als auch präformierte oligomere Aggregate (30 Minuten mit DMSO 1 % vorinkubiert, II.) unter verschiedenen Milieubedingungen jeweils zusammen mit den Fibrillen untersucht.	51
3.22	α -Synuklein-Fibrillen im homologen System: Das Aggregationsverhalten der α -Synukleine auf Monomer (Alexa488)-, Oligomer (Alexa488)- und Fibrillen (Alexa647)-Ebene. Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 12. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	52
3.23	Tau-Fibrillen im homologen System: Das Aggregationsverhalten der Tau-Proteine auf Monomer (Alexa488)-, Oligomer (Alexa488)- und Fibrillen (Alexa647)-Ebene. Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	54
3.24	α -Synuklein-Fibrillen im heterologen System: Das Koaggregationsverhalten von α -Synuklein-Fibrillen (Alexa647) mit Tau-Monomeren und -Oligomeren (Alexa488). Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	56
3.25	Tau-Fibrillen im heterologen System: Das Koaggregationsverhalten von Tau-Fibrillen (Alexa647) mit α -Synuklein-Monomeren und -Oligomeren (Alexa488). Der Ansatz wurde in Tris-Puffer 50 mM, in Tris-Puffer mit DMSO 1 % und mit NP40 0,1 % untersucht. Die Partikelzahl der Monomere betrug ca. 18. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	57
3.26	Untersuchung des Koaggregationsverhaltens von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-Ebene nach Zugabe von Eisenionen (Fe^{3+} , 10 μM) in einer zweiten Messung des Versuchsaufbaus. Die α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Fibrillen waren im Verhältnis 1:1000 mit Alexa647 markiert. Für α -Synuklein (Alexa488) betrug die Partikelzahl ca. 12 - 18. Tau-Protein (Alexa488) zeigte eine Partikelzahl von ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	59

3.27	Untersuchung des Koaggregationsverhaltens von Tau-Protein und α -Synuklein auf Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-Ebene nach Zugabe von Aluminiumionen (Al^{3+} , $10\text{ }\mu\text{M}$) in einer zweiten Messung des Versuchsaufbaus. Die α -Synuklein-Fibrillen und Tau-Fibrillen waren im Verhältnis 1:1000 mit Alexa647 markiert. Für α -Synuklein (Alexa488) betrug die Partikelzahl ca. 12 - 18. Tau-Protein (Alexa488) zeigte eine Partikelzahl von ca. 3. Die Bildüberschrift beschreibt die Pipettier-Reihenfolge. Die Scalierung ist analog zu Abb. 3.2.	61
4.1	Theoretischer Grundgedanke zur Architektur von Koaggregaten. Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Formation von Koaggregaten und der Messmöglichkeit mit Hilfe der FRET Analyse.	73

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	11
2.3	Chemikalien	12
2.6	Verbrauchsmaterialien	14
2.8	Fluoreszenzfarbstoffe	15
2.9	Substanzen für die Proteinanalytik	15
2.10	Medien und Lösungen	16

Literaturverzeichnis

- [1] AGUZZI, A. ; HAASS, C.: Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. In: *Science* 302 (2003), Nr. 5646, S. 814–8
- [2] ANDRASI, E. ; PALI, N. ; MOLNAR, Z. ; KOESEL, S.: Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. In: *J Alzheimers Dis* 7 (2005), Aug, Nr. 4, S. 273–84
- [3] ANDREADIS, A. ; BROWN, W. M. ; KOSIK, K. S.: Structure and novel exons of the human tau gene. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 43, S. 10626–33
- [4] ANGUIANO, M. ; NOWAK, R. J. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 38, S. 11338–43
- [5] APETRI, M. M. ; MAITI, N. C. ; ZAGORSKI, M. G. ; CAREY, P. R. ; ANDERSON, V. E.: Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. In: *J Mol Biol* 355 (2006), Jan, Nr. 1, S. 63–71
- [6] ARAGON, S. R. ; PECORA, R.: Fluorescence correlation spectroscopy and brownian rotational diffusion. In: *Biopolymers* (1975), Nr. 1, S. 119–137
- [7] ARAGON, S. R. ; PECORA, R.: Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. In: *J Chem Phys* (1976), Nr. 64, S. 1791–1803
- [8] ARIMA, K. ; HIRAI, S. ; SUNOHARA, N. ; AOTO, K. ; IZUMIYAMA, Y. ; UEDA, K. ; IKEDA, K. ; KAWAI, M.: Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. In: *Brain Res* 843 (1999), Nr. 1-2, S. 53–61
- [9] BACIA, K. ; SCHWILLE, P.: A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. In: *Methods* 29 (2003), Nr. 1, S. 74–85
- [10] BADER, B.: *Einzelmolekülbasierte Aggregationsanalyse von Alpha-Synuclein und Tau-Protein*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2008

- [11] BALLATORE, C. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. In: *Nat Rev Neurosci* 8 (2007), Nr. 9, S. 663–72
- [12] BAN, T. ; HAMADA, D. ; HASEGAWA, K. ; NAIKI, H. ; GOTO, Y.: Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 19, S. 16462–5
- [13] BARGHORN, S. ; ZHENG-FISCHHOFFER, Q. ; ACKMANN, M. ; BIERNAT, J. ; BERGEN, M. von ; MANDELKOW, E. M. ; MANDELKOW, E.: Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 38, S. 11714–21
- [14] BEHRENDTS, C. ; LANGER, A. ; BOTEVA, R. ; BÖTTCHER, U. ; STEMPEL, M. ; SCHAFFAR, G. ; RAO, B. ; GIESE, A. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; HARTL, F. U.: Chaperonin TRiC Promotes the Assembly of polyQ Expansion Proteins into Nontoxic Oligomers. In: *Molecular cell* (2006), September 15, Nr. 23, S. 887–897
- [15] BERG, D. ; GERLACH, M. ; YODIM, M. B. ; DOUBLE, K. L. ; ZECCA, L. ; RIEDERER, P. ; BECKER, G.: Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. In: *J Neurochem* 79 (2001), Oct, Nr. 2, S. 225–36
- [16] BERKE, S. J. ; PAULSON, H. L.: Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPER hand on neurodegeneration. In: *Curr Opin Genet Dev* 13 (2003), Nr. 3, S. 253–61
- [17] BERTSCH, U. ; WINKLHOFFER, K. F. ; HIRSCHBERGER, T. ; BIESCHKE, J. ; WEBER, P. ; HARTL, F. U. ; TAVAN, P. ; TATZELT, J. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; GIESE, A.: Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. In: *J Virol* 79 (2005), Nr. 12, S. 7785–91
- [18] BIERNAT, J. ; GUSTKE, N. ; DREWES, G. ; MANDELKOW, E. M. ; MANDELKOW, E.: Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. In: *Neuron* 11 (1993), Nr. 1, S. 153–63
- [19] BIESCHKE, J. ; GIESE, A. ; SCHULZ-SCHAEFFER, W. ; ZERR, I. ; POSER, S. ; EIGEN, M. ; KRETZSCHMAR, H.: Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 10, S. 5468–73
- [20] BINDER, L. I. ; FRANKFURTER, A. ; REBHUN, L. I.: The distribution of tau in the mammalian central nervous system. In: *J Cell Biol* 101 (1985), Nr. 4, S. 1371–8

- [21] BOLLER, F. ; MIZUTANI, T. ; ROESSMANN, U. ; GAMBETTI, P.: Parkinson disease, dementia, and Alzheimer disease: clinicopathological correlations. In: *Ann Neurol* 7 (1980), Nr. 4, S. 329–35
- [22] BRAMBLETT, G. T. ; GOEDERT, M. ; JAKES, R. ; MERRICK, S. E. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. In: *Neuron* 10 (1993), Nr. 6, S. 1089–99
- [23] BUCCIANINI, M. ; CALLONI, G. ; CHITI, F. ; FORMIGLI, L. ; NOSI, D. ; DOBSON, C. M. ; STEFANI, M.: Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 30, S. 31374–82
- [24] BUCCIANINI, M. ; GIANNONI, E. ; CHITI, F. ; BARONI, F. ; FORMIGLI, L. ; ZURDO, J. ; TADDEI, N. ; RAMPONI, G. ; DOBSON, C. M. ; STEFANI, M.: Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. In: *Nature* 416 (2002), Nr. 6880, S. 507–11
- [25] BUEE, L. ; BUSSIERE, T. ; BUEE-SCHERRER, V. ; DELACOURTE, A. ; HOF, P. R.: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. In: *Brain Res Brain Res Rev* 33 (2000), Nr. 1, S. 95–130
- [26] BURDICK, D. ; SOREGHAN, B. ; KWON, M. ; KOSMOSKI, J. ; KNAUER, M. ; HENSCHEN, A. ; YATES, J. ; COTMAN, C. ; GLABE, C.: Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 1, S. 546–54
- [27] CABIN, D. E. ; SHIMAZU, K. ; MURPHY, D. ; COLE, N. B. ; GOTTSCHALK, W. ; MCILWAIN, K. L. ; ORRISON, B. ; CHEN, A. ; ELLIS, C. E. ; PAYLOR, R. ; LU, B. ; NUSSBAUM, R. L.: Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. In: *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 20, S. 8797–807
- [28] CASTAGNET, P. I. ; GOLOVKO, M. Y. ; BARCELO-COBLIJN, G. C. ; NUSSBAUM, R. L. ; MURPHY, E. J.: Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. In: *J Neurochem* 94 (2005), Nr. 3, S. 839–49
- [29] CAUGHEY, B. ; LANSBURY, P. T.: Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. In: *Annu Rev Neurosci* 26 (2003), S. 267–98
- [30] CLAYTON, D. F. ; GEORGE, J. M.: The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. In: *Trends Neurosci* 21 (1998), Nr. 6, S. 249–54

- [31] CLEVELAND, D. W. ; HWO, S. Y. ; KIRSCHNER, M. W.: Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. In: *J Mol Biol* 116 (1977), Nr. 2, S. 207–25
- [32] CONWAY, K. A. ; HARPER, J. D. ; LANSBURY, P. T.: Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. In: *Nat Med* 4 (1998), Nr. 11, S. 1318–20
- [33] CONWAY, K. A. ; HARPER, J. D. ; LANSBURY, P. T.: Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. In: *Nat Med* 4 (1998), Nr. 11, S. 1318–20
- [34] CONWAY, K. A. ; LEE, S. J. ; ROCHET, J. C. ; DING, T. T. ; WILLIAMSON, R. E. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 2, S. 571–6
- [35] COUCHIE, D. ; MAVILIA, C. ; GEORGIEFF, I. S. ; LIEM, R. K. ; SHELANSKI, M. L. ; NUNEZ, J.: Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Nr. 10, S. 4378–81
- [36] CROISIER, E. ; MORAN, L. B. ; DEXTER, D. T. ; PEARCE, R. K. ; GRAEBER, M. B.: Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. In: *J Neuroinflammation* 2 (2005), S. 14
- [37] CROSS, D. ; VIAL, C. ; MACCIONI, R. B.: A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. In: *J Cell Sci* 105 (Pt 1) (1993), S. 51–60
- [38] CROWTHER, R. A.: Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991), Nr. 6, S. 2288–92
- [39] CROWTHER, R. A. ; WISCHIK, C. M.: Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. In: *EMBO J* 4 (1985), Nr. 13B, S. 3661–5
- [40] DAVIDSON, W. S. ; JONAS, A. ; CLAYTON, D. F. ; GEORGE, J. M.: Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 16, S. 9443–9
- [41] DELACOURTE, A. ; BUEE, L.: Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. In: *Curr Opin Neurol* 13 (2000), Nr. 4, S. 371–6

- [42] DERAMECOURT, V. ; BOMBOIS, S. ; MAURAGE, C. A. ; GHESTEM, A. ; DRO-BECQ, H. ; VANMECHELEN, E. ; LEBERT, F. ; PASQUIER, F. ; DELACOURTE, A.: Biochemical staging of synucleinopathy and amyloid deposition in dementia with Lewy bodies. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 65 (2006), Nr. 3, S. 278–88
- [43] DICKSON, D. W.: Tau and synuclein and their role in neuropathology. In: *Brain Pathol* 9 (1999), Nr. 4, S. 657–61
- [44] DICKSON, D. W. ; BERGERON, C. ; CHIN, S. S. ; DUYCKAERTS, C. ; HOROUPIAN, D. ; IKEDA, K. ; JELLINGER, K. ; LANTOS, P. L. ; LIPPA, C. F. ; MIRRA, S. S. ; TABATON, M. ; VONSATTEL, J. P. ; WAKABAYASHI, K. ; LITVAN, I.: Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 61 (2002), Nr. 11, S. 935–46
- [45] DICKSON, DW.: Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders. In: *ISN Neuropathology Press* (2003)
- [46] DING, T. T. ; LEE, S. J. ; ROCHET, J. C. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 32, S. 10209–17
- [47] DRECHSEL, D. N. ; HYMAN, A. A. ; COBB, M. H. ; KIRSCHNER, M. W.: Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. In: *Mol Biol Cell* 3 (1992), Nr. 10, S. 1141–54
- [48] DUDA, J. E. ; GIASSEN, B. I. ; MABON, M. E. ; MILLER, D. C. ; GOLBE, L. I. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. In: *Acta Neuropathol* 104 (2002), Nr. 1, S. 7–11
- [49] EIGEN, M ; RIGLER, R.: Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), S. 5740–5747
- [50] ELSON, E. L. ; MAGDE, D.: Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. In: *Biopolymers* (1974), Nr. 1, S. 1–27
- [51] EVOTEC-TECHNOLOGIES, Hamburg: Confocal Fluorescence Data Analysis Technology FCS-plus Manual. (2004)
- [52] FERRI, C. P. ; PRINCE, M. ; BRAYNE, C. ; BRODATY, H. ; FRATIGLIONI, L. ; GANGULI, M. ; HALL, K. ; HASEGAWA, K. ; HENDRIE, H. ; HUANG, Y. ; JORM, A. ; MATHERS, C. ; MENEZES, P. R. ; RIMMER, E. ; SCAZUFCA, M.: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. In: *Lancet* 366 (2005), Nr. 9503, S. 2112–7

- [53] FINK, A. L.: The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. In: *Acc Chem Res* 39 (2006), Nr. 9, S. 628–34
- [54] FORMAN, M. S. ; SCHMIDT, M. L. ; KASTURI, S. ; PERL, D. P. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Tau and alpha-synuclein pathology in amygdala of Parkinsonism-dementia complex patients of Guam. In: *Am J Pathol* 160 (2002), Nr. 5, S. 1725–31
- [55] FORMAN, M. S. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, D.: Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. In: *Nat Med* (2004), Nr. 10, S. 1055–1063
- [56] FÖRSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Ann. Physik.* 437 (1948)
- [57] FRASIER, M. ; WOLOZIN, B.: Following the leader: fibrillization of alpha-synuclein and tau. In: *Exp Neurol* 187 (2004), Jun, Nr. 2, S. 235–9
- [58] FUJIWARA, H. ; HASEGAWA, M. ; DOHMAE, N. ; KAWASHIMA, A. ; MASLIAH, E. ; GOLDBERG, M. S. ; SHEN, J. ; TAKIO, K. ; IWATSUBO, T.: alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. In: *Nat Cell Biol* 4 (2002), Nr. 2, S. 160–4
- [59] FUSTER-MATANZO, A. ; BARREDA, E. G. ; DAWSON, H. N. ; VITEK, M. P. ; AVILA, J. ; HERNANDEZ, F.: Function of tau protein in adult newborn neurons. In: *FEBS Lett* 583 (2009), Nr. 18, S. 3063–8
- [60] GALPERN, W. R. ; LANG, A. E.: Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. In: *Ann Neurol* 59 (2006), Nr. 3, S. 449–58
- [61] GALVAN, M. ; DAVID, J. P. ; DELACOURTE, A. ; LUNA, J. ; MENA, R.: Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer’s disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2. In: *J Alzheimers Dis* 3 (2001), Nr. 4, S. 417–425
- [62] GAMBLIN, T. C. ; BERRY, R. W. ; BINDER, L. I.: Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 51, S. 15009–17
- [63] GAMBLIN, T. C. ; CHEN, F. ; ZAMBRANO, A. ; ABRAHA, A. ; LAGALWAR, S. ; GUILLOZET, A. L. ; LU, M. ; FU, Y. ; GARCIA-SIERRA, F. ; LAPOINTE, N. ; MILLER, R. ; BERRY, R. W. ; BINDER, L. I. ; CRYNS, V. L.: Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 17, S. 10032–7
- [64] GAMBLIN, T. C. ; KING, M. E. ; KURET, J. ; BERRY, R. W. ; BINDER, L. I.: Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 46, S. 14203–10

- [65] GARCIA-SIERRA, F. ; GHOSHAL, N. ; QUINN, B. ; BERRY, R. W. ; BINDER, L. I.: Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. In: *J Alzheimers Dis* 5 (2003), Nr. 2, S. 65–77
- [66] GARZON-RODRIGUEZ, W. ; SEPULVEDA-BECERRA, M. ; MILTON, S. ; GLABE, C. G.: Soluble amyloid Abeta-(1-40) exists as a stable dimer at low concentrations. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 34, S. 21037–44
- [67] GEDDES, J. W.: alpha-Synuclein: a potent inducer of tau pathology. In: *Exp Neurol* 192 (2005), Nr. 2, S. 244–50
- [68] GIASSEN, B. I. ; DUDA, J. E. ; MURRAY, I. V. ; CHEN, Q. ; SOUZA, J. M. ; HURTIG, H. I. ; ISCHIROPOULOS, H. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. In: *Science* 290 (2000), Nr. 5493, S. 985–9
- [69] GIASSEN, B. I. ; FORMAN, M. S. ; HIGUCHI, M. ; GOLBE, L. I. ; GRAVES, C. L. ; KOTZBAUER, P. T. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. In: *Science* 300 (2003), Nr. 5619, S. 636–40
- [70] GIASSEN, B. I. ; MURRAY, I. V. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 4, S. 2380–6
- [71] GIASSEN, B. I. ; URYU, K. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 12, S. 7619–22
- [72] GIESE, A.: *Molekulare Analyse und Einzelpartikeldetektion von Prionproteinaggregaten: neue Perspektiven für die Grundlagenforschung, Diagnostik und Therapie im Bereich neurodegenerativer Krankheiten*. Ludwig-Maximilians-Universität München, Habil., 2005
- [73] GIESE, A. ; BADER, B. ; BIESCHKE, J. ; SCHAFFAR, G. ; ODOY, S. ; KAHLE, P. J. ; HAASS, C. ; KRETZSCHMAR, H.: Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation. In: *Biochem Biophys Res Commun* 333 (2005), Nr. 4, S. 1202–10
- [74] GIESE, A. ; BIESCHKE, J. ; EIGEN, M. ; KRETZSCHMAR, H. A.: Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. In: *Arch Virol Suppl* (2000), Nr. 16, S. 161–71
- [75] GIESE, A. ; LEVIN, J. ; BERTSCH, U. ; KRETZSCHMAR, H.: Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. In: *Biochem Biophys Res Commun* 320 (2004), Nr. 4, S. 1240–6

- [76] GLABE, C. G.: Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. In: *Neurobiol Aging* 27 (2006), Nr. 4, S. 570–5
- [77] GLABE, C. G. ; KAYED, R.: Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. In: *Neurology* 66 (2006), Nr. 2 Suppl 1, S. S74–8
- [78] GOEDERT, M.: Introduction to the tauopathies. In: Dickson DW, editor. Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders. In: *ISN Press* (2003), S. 82–85
- [79] GOEDERT, M.: Neurodegenerative tauopathy in the worm. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 17, S. 9653–5
- [80] GOEDERT, M. ; JAKES, R.: Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. In: *EMBO J* 9 (1990), Nr. 13, S. 4225–30
- [81] GOEDERT, M. ; JAKES, R. ; SPILLANTINI, M. G. ; HASEGAWA, M. ; SMITH, M. J. ; CROWTHER, R. A.: Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. In: *Nature* 383 (1996), Nr. 6600, S. 550–3
- [82] GOEDERT, M. ; SPILLANTINI, M. G. ; JAKES, R. ; RUTHERFORD, D. ; CROWTHER, R. A.: Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. In: *Neuron* 3 (1989a), Nr. 4, S. 519–26
- [83] GOEDERT, M. ; SPILLANTINI, M. G. ; POTIER, M. C. ; ULRICH, J. ; CROWTHER, R. A.: Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. In: *EMBO J* 8 (1989b), Nr. 2, S. 393–9
- [84] GOEDERT, M. ; WISCHIK, C. M. ; CROWTHER, R. A. ; WALKER, J. E. ; KLUG, A.: Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988), Nr. 11, S. 4051–5
- [85] GOOD, P. F. ; PERL, D. P. ; BIERER, L. M. ; SCHMEIDLER, J.: Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. In: *Ann Neurol* 31 (1992), Nr. 3, S. 286–92
- [86] GREGOR, K. ; WENNING, G. K. ; JELLINGER, K. A.: The role of alpha-synuclein and tau in neurodegenerative movement disorders. In: *Curr Opin Neurol* 18 (2005), Nr. 4, S. 357–62

- [87] GROVER, A. ; ENGLAND, E. ; BAKER, M. ; SAHARA, N. ; ADAMSON, J. ; GRANGER, B. ; HOULDEN, H. ; PASSANT, U. ; YEN, S. H. ; DETURE, M. ; HUTTON, M.: A novel tau mutation in exon 9 (1260V) causes a four-repeat tauopathy. In: *Exp Neurol* 184 (2003), Nr. 1, S. 131–40
- [88] GRUNDKE-IQBAL, I. ; IQBAL, K. ; TUNG, Y. C. ; QUINLAN, M. ; WISNIEWSKI, H. M. ; BINDER, L. I.: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986), Nr. 13, S. 4913–7
- [89] HAASS, C. ; SELKOE, D. J.: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Nr. 2, S. 101–12
- [90] HARDY, J. ; SELKOE, D. J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. In: *Science* 297 (2002), Nr. 5580, S. 353–6
- [91] HARPER, J. D. ; WONG, S. S. ; LIEBER, C. M. ; LANSBURY, P. T.: Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. In: *Chem Biol* 4 (1997), Nr. 2, S. 119–25
- [92] HARRINGTON, C. R. ; PERRY, R. H. ; PERRY, E. K. ; HURT, J. ; MCKEITH, I. G. ; ROTH, M. ; WISCHIK, C. M.: Senile dementia of Lewy body type and Alzheimer type are biochemically distinct in terms of paired helical filaments and hyperphosphorylated tau protein. In: *Dementia* 5 (1994), Nr. 5, S. 215–28
- [93] HASEGAWA, M. ; FUJIWARA, H. ; NONAKA, T. ; WAKABAYASHI, K. ; TAKAHASHI, H. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; MANN, D. ; IWATSUBO, T.: Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 50, S. 49071–6
- [94] HASEGAWA, M. ; JAKES, R. ; CROWTHER, R. A. ; LEE, V. M. ; IHARA, Y. ; GOEDERT, M.: Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. In: *FEBS Lett* 384 (1996), Nr. 1, S. 25–30
- [95] HILBICH, C. ; KISTERS-WOIKE, B. ; REED, J. ; MASTERS, C. L. ; BEYREUTHER, K.: Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. In: *J Mol Biol* 218 (1991), Nr. 1, S. 149–63
- [96] HIRAOKA, S. ; YAO, T.-M. ; MINOURA, K. ; TOMOO, K. ; SUMIDA, M. ; TANIGUCHI, T. ; ISHIDA, T.: Conformational transition state is responsible for assembly of microtubule-binding domain of tau protein. In: *Biochem Biophys Res Commun* 315 (2004), Mar, Nr. 3, S. 659–63

- [97] HOFFMANN, R. ; LEE, V. M. ; LEIGHT, S. ; VARGA, I. ; OTVOS, Jr. L.: Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 26, S. 8114–24
- [98] HÖGEN, T.: *Einzelmolekülanalyse von eiseninduzierten, porenbildenden alpha-Synucleinoligomeren: Von der molekularen Pathologie zur kausalen Therapie*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2009
- [99] HONG, M. ; ZHUKAREVA, V. ; VOGELSBURG-RAGAGLIA, V. ; WSZOLEK, Z. ; REED, L. ; MILLER, B. I. ; GESCHWIND, D. H. ; BIRD, T. D. ; MCKEEL, D. ; GOATE, A. ; MORRIS, J. C. ; WILHELMSSEN, K. C. ; SCHELLENBERG, G. D. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. In: *Science* 282 (1998), Nr. 5395, S. 1914–7
- [100] HORIGUCHI, T. ; URYU, K. ; GIASSEN, B. I. ; ISCHIROPOULOS, H. ; LIGHTFOOT, R. ; BELLMANN, C. ; RICHTER-LANDSBERG, C. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. In: *Am J Pathol* 163 (2003), Nr. 3, S. 1021–31
- [101] HOYER, W. ; ANTONY, T. ; CHERNY, D. ; HEIM, G. ; JOVIN, T. M. ; SUBRAMANIAM, V.: Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. In: *J Mol Biol* 322 (2002), Sep, Nr. 2, S. 383–93
- [102] IHARA, Y. ; NUKINA, N. ; MIURA, R. ; OGAWARA, M.: Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. In: *J Biochem* 99 (1986), Nr. 6, S. 1807–10
- [103] IQBAL, K. ; ALONSO, A. C. ; GONG, C. X. ; KHATOON, S. ; PEI, J. J. ; WANG, J. Z. ; GRUNDKE-IQBAL, I.: Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. In: *J Neural Transm Suppl* 53 (1998), S. 169–80
- [104] ISHIZAWA, T. ; MATTLA, P. ; DAVIES, P. ; WANG, D. ; DICKSON, D. W.: Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 62 (2003), Nr. 4, S. 389–97
- [105] IWAI, A.: Properties of NACP/alpha-synuclein and its role in Alzheimer's disease. In: *Biochim Biophys Acta* 1502 (2000), Nr. 1, S. 95–109
- [106] IWAI, A. ; MASLIAH, E. ; YOSHIMOTO, M. ; GE, N. ; FLANAGAN, L. ; SILVA, H. A. ; KITTEL, A. ; SAITOH, T.: The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. In: *Neuron* 14 (1995), Nr. 2, S. 467–75

- [107] JANSEN, K. ; SCHAFER, O. ; BIRKMANN, E. ; POST, K. ; SERBAN, H. ; PRUSINER, S. B. ; RIESNER, D.: Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. In: *Biol Chem* 382 (2001), Nr. 4, S. 683–91
- [108] JARRETT, J. T. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Seeding öne-dimensional crystallizationöf amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? In: *Cell* 73 (1993), Nr. 6, S. 1055–8
- [109] JELLINGER, K.: New developments in the pathology of Parkinson’s disease. In: *Adv Neurol* 53 (1990), S. 1–16
- [110] JELLINGER, K. A.: Neuropathological spectrum of synucleinopathies. In: *Mov Disord* 18 Suppl 6 (2003), S. S2–12
- [111] JELLINGER, K. A.: General aspects of neurodegeneration. In: *J Neural Transm Suppl* (2003a), Nr. 65, S. 101–44
- [112] JELLINGER, K. A.: Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. In: *Neurodegener Dis* 5 (2008), Nr. 3-4, S. 118–21
- [113] JELLINGER, K. A. ; ATTEMS, J.: Does striatal pathology distinguish Parkinson disease with dementia and dementia with Lewy bodies? In: *Acta Neuropathol* 112 (2006), Nr. 3, S. 253–60
- [114] JENCO, J. M. ; RAWLINGSON, A. ; DANIELS, B. ; MORRIS, A. J.: Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. In: *Biochemistry* 37 (1998), Nr. 14, S. 4901–9
- [115] JO, E. ; MCLAURIN, J. ; YIP, C. M. ; ST GEORGE-HYSLOP, P. ; FRASER, P. E.: alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 44, S. 34328–34
- [116] KAHLE, P. J. ; NEUMANN, M. ; OZMEN, L. ; MULLER, V. ; ODOY, S. ; OKAMOTO, N. ; JACOBSEN, H. ; IWATSUBO, T. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; TAKAHASHI, H. ; WAKABAYASHI, K. ; BOGDANOVIC, N. ; RIEDERER, P. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; HAASS, C.: Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. In: *Am J Pathol* 159 (2001), Nr. 6, S. 2215–25
- [117] KAMPERS, T. ; FRIEDHOFF, P. ; BIERNAT, J. ; MANDELKOW, E. M. ; MANDELKOW, E.: RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. In: *FEBS Lett* 399 (1996), Nr. 3, S. 344–9

- [118] KASK, P. ; PALO, K. ; FAY, N. ; BRAND, L. ; METS, U. ; ULLMANN, D. ; JUNG-MANN, J. ; PSCHORR, J. ; GALL, K.: Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications. In: *Biophys J* 78 (2000), Nr. 4, S. 1703–13
- [119] KASK, P. ; PALO, K. ; ULLMANN, D. ; GALL, K.: Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 24, S. 13756–61
- [120] KAYED, R. ; HEAD, E. ; THOMPSON, J. L. ; McINTIRE, T. M. ; MILTON, S. C. ; COTMAN, C. W. ; GLABE, C. G.: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. In: *Science* 300 (2003), Nr. 5618, S. 486–9
- [121] KAYED, R. ; SOKOLOV, Y. ; EDMONDS, B. ; McINTIRE, T. M. ; MILTON, S. C. ; HALL, J. E. ; GLABE, C. G.: Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 45, S. 46363–6
- [122] KIM, S. ; SEO, J. H. ; SUH, Y. H.: Alpha-synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. In: *Parkinsonism Relat Disord* 10 Suppl 1 (2004), S. S9–13
- [123] KLATZO, I. ; WISNIEWSKI, H. ; STREICHER, E.: Experimental production of neurofibrillary degeneration. I. Light microscopic observations. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 24 (1965), Apr, S. 187–99
- [124] KONDO, J. ; HONDA, T. ; MORI, H. ; HAMADA, Y. ; MIURA, R. ; OGAWARA, M. ; IHARA, Y.: The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. In: *Neuron* 1 (1988), Nr. 9, S. 827–34
- [125] KOSIK, K. S. ; JOACHIM, C. L. ; SELKOE, D. J.: Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986), Nr. 11, S. 4044–8
- [126] KOSIK, K. S. ; ORECCHIO, L. D. ; BINDER, L. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M. ; LEE, G.: Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. In: *Neuron* 1 (1988), Nr. 9, S. 817–25
- [127] KSIEZAK-REDING, H. ; YEN, S. H.: Structural stability of paired helical filaments requires microtubule-binding domains of tau: a model for self-association. In: *Neuron* 6 (1991), Nr. 5, S. 717–28
- [128] KUMAR-SINGH, S. ; VAN BROECKHOVEN, C.: Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances. In: *Brain Pathol* 17 (2007), Nr. 1, S. 104–14

- [129] KURET, J. ; CHIRITA, C. N. ; CONGDON, E. E. ; KANNANAYAKAL, T. ; LI, G. ; NECULA, M. ; YIN, H. ; ZHONG, Q.: Pathways of tau fibrillization. In: *Biochim Biophys Acta* 1739 (2005), Nr. 2-3, S. 167–78
- [130] KURET, J. ; CONGDON, E. E. ; LI, G. ; YIN, H. ; YU, X. ; ZHONG, Q.: Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. In: *Microsc Res Tech* 67 (2005), Nr. 3-4, S. 141–55
- [131] LAEMMLI, U K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–5
- [132] LAMBERT, M. P. ; BARLOW, A. K. ; CHROMY, B. A. ; EDWARDS, C. ; FREED, R. ; LIOSATOS, M. ; MORGAN, T. E. ; ROZOVSKY, I. ; TROMMER, B. ; VIOLA, K. L. ; WALS, P. ; ZHANG, C. ; FINCH, C. E. ; KRAFFT, G. A. ; KLEIN, W. L.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 11, S. 6448–53
- [133] LASHUEL, H. A. ; HARTLEY, D. ; PETRE, B. M. ; WALZ, T. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. In: *Nature* 418 (2002), Nr. 6895, S. 291
- [134] LASHUEL, H. A. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? In: *Q Rev Biophys* 39 (2006), Nr. 2, S. 167–201
- [135] LEDESMA, M. D. ; BONAY, P. ; AVILA, J.: Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. In: *J Neurochem* 65 (1995), Nr. 4, S. 1658–64
- [136] LEDESMA, M. D. ; BONAY, P. ; COLACO, C. ; AVILA, J.: Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 34, S. 21614–9
- [137] LEE, V. M. ; BALIN, B. J. ; OTVOS, Jr. L. ; TROJANOWSKI, J. Q.: A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. In: *Science* 251 (1991), Nr. 4994, S. 675–8
- [138] LEE, V. M. ; GIASSEN, B. I. ; TROJANOWSKI, J. Q.: More than just two peas in a pod: common amyloidogenic properties of tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. In: *Trends Neurosci* 27 (2004), Nr. 3, S. 129–34
- [139] LEE, V. M. ; GOEDERT, M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Neurodegenerative tauopathies. In: *Annu Rev. Neurosci.* (2001), Nr. 24, S. 1121–1159
- [140] LEVIN, J.: *Prionerkrankungen: Analyse von Aggregationsprozessen des Prionproteins auf Einzelmolekülebene*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2008

- [141] LEVIN, J. ; BERTSCH, U. ; KRETZSCHMAR, H. ; GIESE, A.: Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates. In: *Biochem Biophys Res Commun* 329 (2005), Nr. 4, S. 1200–7
- [142] LI, J. ; UVERSKY, V. N. ; FINK, A. L.: Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 38, S. 11604–13
- [143] LIPPA, C. F. ; FUJIWARA, H. ; MANN, D. M. ; GIASSEN, B. ; BABA, M. ; SCHMIDT, M. L. ; NEE, L. E. ; O'CONNELL, B. ; POLLEN, D. A. ; ST GEORGE-HYSLOP, P. ; GHETTI, B. ; NOCHLIN, D. ; BIRD, T. D. ; CAIRNS, N. J. ; LEE, V. M. ; IWATSUBO, T. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. In: *Am J Pathol* 153 (1998), Nr. 5, S. 1365–70
- [144] LIPPA, C. F. ; SCHMIDT, M. L. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. In: *Ann Neurol* 45 (1999), Nr. 3, S. 353–7
- [145] LITVAN, I. ; HAUW, J. J. ; BARTKO, J. J. ; LANTOS, P. L. ; DANIEL, S. E. ; HOROUPIAN, D. S. ; MCKEE, A. ; DICKSON, D. ; BANCHER, C. ; TABATON, M. ; JELLINGER, K. ; ANDERSON, D. W.: Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (1996), Nr. 1, S. 97–105
- [146] LIU, C. W. ; LEE, G. ; JAY, D. G.: Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons. In: *Cell Motil Cytoskeleton* 43 (1999), Nr. 3, S. 232–42
- [147] LOMAKIN, A. ; TELOW, D. B. ; KIRSCHNER, D. A. ; BENEDEK, G. B.: Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 15, S. 7942–7
- [148] LOPRESTI, P. ; SZUCHET, S. ; PAPASOZOMENOS, S. C. ; ZINKOWSKI, R. P. ; BINDER, L. I.: Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 22, S. 10369–73
- [149] LOVELL, M. A. ; ROBERTSON, J. D. ; TEESDALE, W. J. ; CAMPBELL, J. L. ; MARKESBERY, W. R.: Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. In: *J Neurol Sci* 158 (1998), Nr. 1, S. 47–52

- [150] LYNCH, T. ; CHERNY, R. A. ; BUSH, A. I.: Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of abeta-metal interactions. In: *Exp Gerontol* 35 (2000), Nr. 4, S. 445–51
- [151] MACCIONI, R. B. ; MUNOZ, J. P. ; BARBEITO, L.: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. In: *Arch Med Res* 32 (2001), Nr. 5, S. 367–81
- [152] MAGDE, D. ; ELSON, E. L. ; WEBB, W. W.: Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. In: *Biopolymers* 13 (1974), Nr. 1, S. 29–61
- [153] MAGDE, D. ; ELSON, EL. ; WEBB, WW.: Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Physical Review Letters* (1972), Nr. 29, S. 705–708
- [154] MAITI, S. ; HAUPTS, U. ; WEBB, W. W.: Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 22, S. 11753–7
- [155] MANDAL, P. K. ; PETTEGREW, J. W. ; MASLIAH, E. ; HAMILTON, R. L. ; MANDAL, R.: Interaction between Abeta peptide and alpha synuclein: molecular mechanisms in overlapping pathology of Alzheimer's and Parkinson's in dementia with Lewy body disease. In: *Neurochem Res* 31 (2006), Nr. 9, S. 1153–62
- [156] MARIES, E. ; DASS, B. ; COLLIER, T. J. ; KORDOWER, J. H. ; STEECE-COLLIER, K.: The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. In: *Nat Rev Neurosci* 4 (2003), Nr. 9, S. 727–38
- [157] MARKESBERY, W. R. ; EHMANN, W. D.: Aluminum and Alzheimer's disease. In: *Clin. Neurosci.* (1993), Nr. 1, S. 212–218
- [158] MARKESBERY, W R. ; EHMANN, W D. ; ALAUDDIN, M ; HOSSAIN, T I.: Brain trace element concentrations in aging. In: *Neurobiol Aging* 5 (1984), Nr. 1, S. 19–28
- [159] MARUI, W. ; ISEKI, E. ; UEDA, K. ; KOSAKA, K.: Occurrence of human alpha-synuclein immunoreactive neurons with neurofibrillary tangle formation in the limbic areas of patients with Alzheimer's disease. In: *J Neurol Sci* 174 (2000), Nr. 2, S. 81–4
- [160] MASEL, J. ; JANSEN, V. A. ; NOWAK, M. A.: Quantifying the kinetic parameters of prion replication. In: *Biophys Chem* 77 (1999), Nr. 2-3, S. 139–52
- [161] MCDERMOTT, J R. ; SMITH, A I. ; IQBAL, K ; WISNIEWSKI, H M.: Brain aluminum in aging and Alzheimer disease. In: *Neurology* 29 (1979), Jun, Nr. 6, S. 809–14

- [162] McKEITH, I. G. ; GALASKO, D. ; KOSAKA, K. ; PERRY, E. K. ; DICKSON, D. W. ; HANSEN, L. A. ; SALMON, D. P. ; LOWE, J. ; MIRRA, S. S. ; BYRNE, E. J. ; LENNOX, G. ; QUINN, N. P. ; EDWARDSON, J. A. ; INCE, P. G. ; BERGERON, C. ; BURNS, A. ; MILLER, B. L. ; LOVESTONE, S. ; COLLERTON, D. ; JANSEN, E. N. ; BALLARD, C. ; VOS, R. A. ; WILCOCK, G. K. ; JELLINGER, K. A. ; PERRY, R. H.: Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. In: *Neurology* 47 (1996), Nr. 5, S. 1113–24
- [163] McLACHLAN, D. R.: Aluminum and the risk for Alzheimer's disease. In: *Environmetrics* (1995), Nr. 6, S. 233–275
- [164] MENA, R. ; EDWARDS, P. C. ; HARRINGTON, C. R. ; MUKAETOVA-LADINSKA, E. B. ; WISCHIK, C. M.: Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. In: *Acta Neuropathol* 91 (1996), Nr. 6, S. 633–41
- [165] MIAKE, H. ; MIZUSAWA, H. ; IWATSUBO, T. ; HASEGAWA, M.: Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 21, S. 19213–9
- [166] MINOURA, K. ; MIZUSHIMA, F. ; TOKIMASA, M. ; HIRAOKA, S. ; TOMOO, K. ; SUMIDA, M. ; TANIGUCHI, T. ; ISHIDA, T.: Structural evaluation of conformational transition state responsible for self-assembly of tau microtubule-binding domain. In: *Biochem Biophys Res Commun* 327 (2005), Feb, Nr. 4, S. 1100–4
- [167] MOORE, D. J. ; WEST, A. B. ; DAWSON, V. L. ; DAWSON, T. M.: Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. In: *Annu Rev Neurosci* 28 (2005), S. 57–87
- [168] MORI, F. ; TANJI, K. ; YOSHIMOTO, M. ; TAKAHASHI, H. ; WAKABAYASHI, K.: Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. In: *Exp Neurol* 176 (2002), Nr. 1, S. 98–104
- [169] MORISHIMA-KAWASHIMA, M. ; HASEGAWA, M. ; TAKIO, K. ; SUZUKI, M. ; YOSHIDA, H. ; WATANABE, A. ; TITANI, K. ; IHARA, Y.: Hyperphosphorylation of tau in PHF. In: *Neurobiol Aging* 16 (1995), Nr. 3, S. 365–71; discussion 371–80
- [170] MUNISHKINA, L. A. ; PHELAN, C. ; UVERSKY, V. N. ; FINK, A. L.: Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. In: *Biochemistry* 42 (2003), Mar, Nr. 9, S. 2720–30

- [171] MURAYAMA, H. ; SHIN, R. W. ; HIGUCHI, J. ; SHIBUYA, S. ; MURAMOTO, T. ; KITAMOTO, T.: Interaction of aluminum with PHFtau in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method. In: *Am J Pathol* 155 (1999), Nr. 3, S. 877–85
- [172] NACHARAJU, P. ; LEWIS, J. ; EASSON, C. ; YEN, S. ; HACKETT, J. ; HUTTON, M. ; YEN, S. H.: Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. In: *FEBS Lett* 447 (1999), Nr. 2-3, S. 195–9
- [173] NACIMIENTO, W.: Parkinson-plus-syndromes. In: *Fortschr Neurol Psychiatr* 74 (2006), Nr. 3, S. 165–78; quiz 179–80
- [174] NAIKI, H. ; HIGUCHI, K. ; HOSOKAWA, M. ; TAKEDA, T.: Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. In: *Anal Biochem* 177 (1989), Nr. 2, S. 244–9
- [175] NEUMANN, M. ; IGAZ, L. M. ; KWONG, L. K. ; NAKASHIMA-YASUDA, H. ; KOLB, S. J. ; DREYFUSS, G. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Absence of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and survival motor neuron protein in TDP-43 positive inclusions in frontotemporal lobar degeneration. In: *Acta Neuropathol* 113 (2007a), Nr. 5, S. 543–8
- [176] NEUMANN, M. ; KAHLE, P. J. ; GIASSON, B. I. ; OZMEN, L. ; BORRONI, E. ; SPOOREN, W. ; MULLER, V. ; ODOY, S. ; FUJIWARA, H. ; HASEGAWA, M. ; IWATSUBO, T. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; HAASS, C.: Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. In: *J Clin Invest* 110 (2002), Nr. 10, S. 1429–39
- [177] NEUMANN, M. ; KRETZSCHMAR, H. A.: Molecular neuropathology of Non-Alzheimer dementia. In: *Pathologe* 29 (2008), Nr. 6, S. 434–41
- [178] NEUMANN, M. ; KWONG, L. K. ; SAMPATHU, D. M. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: TDP-43 proteinopathy in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis: protein misfolding diseases without amyloidosis. In: *Arch Neurol* 64 (2007b), Nr. 10, S. 1388–94
- [179] NEUMANN, M. ; KWONG, L. K. ; TRUAX, A. C. ; VANMASSENHOVE, B. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; VAN DEERLIN, V. M. ; CLARK, C. M. ; GROSSMAN, M. ; MILLER, B. L. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 66 (2007c), Nr. 3, S. 177–83
- [180] NEUMANN, M. ; MACKENZIE, I. R. ; CAIRNS, N. J. ; BOYER, P. J. ; MARKESBERY, W. R. ; SMITH, C. D. ; TAYLOR, J. P. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; KIMONIS, V. E. ;

- FORMAN, M. S.: TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 66 (2007d), Nr. 2, S. 152–7
- [181] NEUMANN, M. ; MULLER, V. ; GORNER, K. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; HAASS, C. ; KAHLE, P. J.: Pathological properties of the Parkinson's disease-associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. In: *Acta Neuropathol* 107 (2004), Nr. 6, S. 489–96
- [182] NEUMANN, M. ; SAMPATHU, D. M. ; KWONG, L. K. ; TRUAX, A. C. ; MICSENYI, M. C. ; CHOU, T. T. ; BRUCE, J. ; SCHUCK, T. ; GROSSMAN, M. ; CLARK, C. M. ; MCCLUSKEY, L. F. ; MILLER, B. L. ; MASLIAH, E. ; MACKENZIE, I. R. ; FELDMAN, H. ; FEIDEN, W. ; KRETZSCHMAR, H. A. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. In: *Science* 314 (2006), Nr. 5796, S. 130–3
- [183] NEVE, R. L. ; HARRIS, P. ; KOSIK, K. S. ; KURNIT, D. M. ; DONLON, T. A.: Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. In: *Brain Res* 387 (1986), Nr. 3, S. 271–80
- [184] NEWMAN, J. ; RISSMAN, R. A. ; SARSOZA, F. ; KIM, R. C. ; DICK, M. ; BENNETT, D. A. ; COTMAN, C. W. ; ROHN, T. T. ; HEAD, E.: Caspase-cleaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology. In: *Acta Neuropathol* 110 (2005), Nr. 2, S. 135–44
- [185] PENG, X. ; TEHRANIAN, R. ; DIETRICH, P. ; STEFANIS, L. ; PEREZ, R. G.: Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. In: *J Cell Sci* 118 (2005), Nr. Pt 15, S. 3523–30
- [186] PEREZ, M. ; VALPUESTA, J. M. ; GARCINI, E. M. ; QUINTANA, C. ; ARRASATE, M. ; LOPEZ CARRASCOSA, J. L. ; RABANO, A. ; YEBENES, J. Garcia d. ; AVILA, J.: Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. In: *Am J Pathol* 152 (1998), Nr. 6, S. 1531–9
- [187] PEREZ, R. G. ; HASTINGS, T. G.: Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? In: *J Neurochem* 89 (2004), Nr. 6, S. 1318–24
- [188] PITSCHKE, M. ; PRIOR, R. ; HAUPT, M. ; RIESNER, D.: Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Nat Med* 4 (1998), Nr. 7, S. 832–4
- [189] POST, K. ; PITSCHKE, M. ; SCHAFER, O. ; WILLE, H. ; APPEL, T. R. ; KIRSCH, D. ; MEHLHORN, I. ; SERBAN, H. ; PRUSINER, S. B. ; RIESNER, D.: Rapid acquisition

- of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. In: *Biol Chem* 379 (1998), Nr. 11, S. 1307–17
- [190] QIAN, Z. M. ; SHEN, X.: Brain iron transport and neurodegeneration. In: *Trends Mol Med* 7 (2001), Nr. 3, S. 103–8
- [191] QUINTANA, C. ; LANCIN, M. ; MARHIC, C. ; PEREZ, M. ; MARTIN-BENITO, J. ; AVILA, J. ; CARRASCOSA, J. L.: Initial studies with high resolution TEM and electron energy loss spectroscopy studies of ferritin cores extracted from brains of patients with progressive supranuclear palsy and Alzheimer disease. In: *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46 (2000), Nr. 4, S. 807–20
- [192] RICHTER-LANDSBERG, C. ; GORATH, M. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: alpha-synuclein is developmentally expressed in cultured rat brain oligodendrocytes. In: *J Neurosci Res* 62 (2000), Nr. 1, S. 9–14
- [193] RIGLER, Mets U. R. ; WIDENGREN, J. ; KASK, P.: Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. In: *European Biophysics Journal* (1993), Nr. 22, S. 169–175
- [194] RIGLER, R. ; J., Widengren ; METS, U.: Interactions and kinetics of single molecules as observed by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Fluorescence Spectroscopy* (1992), S. 13–24
- [195] RISSMAN, R. A. ; POON, W. W. ; BLURTON-JONES, M. ; ODDO, S. ; TORP, R. ; VITEK, M. P. ; LAFERLA, F. M. ; ROHN, T. T. ; COTMAN, C. W.: Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Nr. 1, S. 121–30
- [196] ROSS, C. A. ; POIRIER, M. A.: Protein aggregation and neurodegenerative disease. In: *Nat Med* 10 Suppl (2004), S. S10–7
- [197] RZEPECKI, P. ; NAGEL-STEGER, L. ; FEUERSTEIN, S. ; LINNE, U. ; MOLT, O. ; ZADMARD, R. ; ASCHERMANN, K. ; WEHNER, M. ; SCHRADER, T. ; RIESNER, D.: Prevention of Alzheimer's disease-associated Abeta aggregation by rationally designed nonpeptidic beta-sheet ligands. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 46, S. 47497–505
- [198] SARAGONI, L. ; HERNANDEZ, P. ; MACCIONI, R. B.: Differential association of tau with subsets of microtubules containing posttranslationally-modified tubulin variants in neuroblastoma cells. In: *Neurochem Res* 25 (2000), Nr. 1, S. 59–70
- [199] SAYRE, L. M. ; PERRY, G. ; SMITH, M. A.: Redox metals and neurodegenerative disease. In: *Curr Opin Chem Biol* 3 (1999), Nr. 2, S. 220–5

- [200] SCHMIDT, M. L. ; MARTIN, J. A. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Convergence of Lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of Alzheimer's disease and Lewy body disorders. In: *Acta Neuropathol* 91 (1996), Nr. 5, S. 475–81
- [201] SCHWILLE, P.: *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*, Technische Universität Braunschweig, Diss., 1997
- [202] SCHWILLE, P. ; BIESCHKE, J. ; OEHLENSCHLAGER, F.: Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. In: *Biophys Chem* 66 (1997b), Nr. 2-3, S. 211–28
- [203] SCHWILLE, P. ; MEYER-ALMES, F. J. ; RIGLER, R.: Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. In: *Biophys J* 72 (1997c), Nr. 4, S. 1878–86
- [204] SCOTT, C. W. ; FIELES, A. ; SYGOWSKI, L. A. ; CAPUTO, C. B.: Aggregation of tau protein by aluminum. In: *Brain Res* 628 (1993), Nr. 1-2, S. 77–84
- [205] SERPELL, L. C. ; BERRIMAN, J. ; JAKES, R. ; GOEDERT, M. ; CROWTHER, R. A.: Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 9, S. 4897–902
- [206] SHIN, R. W.: Aluminum, tau and neurofibrillary degeneration, in: C. Exley (Ed.), *Aluminum and Alzheimer's Disease. the Science That Describes the Link*. In: *Elsevier, Amsterdam* (2001), S. 411–420
- [207] SHIN, R. W. ; IWAKI, T. ; KITAMOTO, T. ; TATEISHI, J.: Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. In: *Lab Invest* 64 (1991), Nr. 5, S. 693–702
- [208] SHIN, R. W. ; KRUCK, T. P. ; MURAYAMA, H. ; KITAMOTO, T.: A novel trivalent cation chelator Feralex dissociates binding of aluminum and iron associated with hyperphosphorylated tau of Alzheimer's disease. In: *Brain Res* 961 (2003), Nr. 1, S. 139–46
- [209] SHIN, R. W. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. In: *J Neurosci* 14 (1994), Nr. 11 Pt 2, S. 7221–33
- [210] SHIN, R. W. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q.: Neurofibrillary pathology and aluminum in Alzheimer's disease. In: *Histol Histopathol* 10 (1995), Nr. 4, S. 969–78
- [211] SMALL, D. H. ; MOK, S. S. ; BORNSTEIN, J. C.: Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. In: *Nat Rev Neurosci* 2 (2001), Nr. 8, S. 595–8

- [212] SMITH, M. A. ; HARRIS, P. L. ; SAYRE, L. M. ; PERRY, G.: Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 18, S. 9866–8
- [213] SMITH, P K. ; KROHN, R I. ; HERMANSON, G T. ; MALLIA, A K. ; GARTNER, F H. ; PROVENZANO, M D. ; FUJIMOTO, E K. ; GOEKE, N M. ; OLSON, B J. ; KLENK, D C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem* 150 (1985), Oct, Nr. 1, S. 76–85
- [214] SOREGHAN, B. ; KOSMOSKI, J. ; GLABE, C.: Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 46, S. 28551–4
- [215] SPILLANTINI, M. G. ; BIRD, T. D. ; GHETTI, B.: Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. In: *Brain Pathol* 8 (1998a), Nr. 2, S. 387–402
- [216] SPILLANTINI, M. G. ; CROWTHER, R. A. ; JAKES, R. ; HASEGAWA, M. ; GOEDERT, M.: alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998b), Nr. 11, S. 6469–73
- [217] SPILLANTINI, M. G. ; MURRELL, J. R. ; GOEDERT, M. ; FARLOW, M. R. ; KLUG, A. ; GHETTI, B.: Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 13, S. 7737–41
- [218] SPILLANTINI, M. G. ; SCHMIDT, M. L. ; LEE, V. M. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; JAKES, R. ; GOEDERT, M.: Alpha-synuclein in Lewy bodies. In: *Nature* 388 (1997), Nr. 6645, S. 839–40
- [219] STRONG, C. ; ANDERTON, B. H. ; PERRY, R. H. ; PERRY, E. K. ; INCE, P. G. ; LOVESTONE, S.: Abnormally phosphorylated tau protein in senile dementia of Lewy body type and Alzheimer disease: evidence that the disorders are distinct. In: *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9 (1995), Nr. 4, S. 218–22
- [220] SYME, C. D. ; BLANCH, E. W. ; HOLT, C. ; JAKES, R. ; GOEDERT, M. ; HECHT, L. ; BARRON, L. D.: A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins. In: *Eur J Biochem* 269 (2002), Nr. 1, S. 148–56
- [221] TAKEMURA, R. ; OKABE, S. ; UMEYAMA, T. ; KANAI, Y. ; COWAN, N. J. ; HIROKAWA, N.: Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. In: *J Cell Sci* 103 (Pt 4) (1992), S. 953–64

- [222] TJERNBERG, L. O. ; PRAMANIK, A. ; BJORLING, S. ; THYBERG, P. ; THYBERG, J. ; NORDSTEDT, C. ; BERNDT, K. D. ; TERENIUS, L. ; RIGLER, R.: Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy. In: *Chem Biol* 6 (1999), Nr. 1, S. 53–62
- [223] TOLNAY, M. ; PROBST, A.: REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 25 (1999), Nr. 3, S. 171–87
- [224] TU, P. H. ; GALVIN, J. E. ; BABA, M. ; GIASSON, B. ; TOMITA, T. ; LEIGHT, S. ; NAKAJO, S. ; IWATSUBO, T. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; LEE, V. M.: Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. In: *Ann Neurol* 44 (1998), Nr. 3, S. 415–22
- [225] UCHIKADO, H. ; LIN, W. L. ; DELUCIA, M. W. ; DICKSON, D. W.: Alzheimer disease with amygdala Lewy bodies: a distinct form of alpha-synucleinopathy. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 65 (2006), Nr. 7, S. 685–97
- [226] UEDA, K. ; FUKUSHIMA, H. ; MASLIAH, E. ; XIA, Y. ; IWAI, A. ; YOSHIMOTO, M. ; OTERO, D. A. ; KONDO, J. ; IHARA, Y. ; SAITOH, T.: Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), Nr. 23, S. 11282–6
- [227] UVERSKY, V. N. ; LI, J. ; FINK, A. L.: Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 14, S. 10737–44
- [228] UVERSKY, V. N. ; LI, J. ; FINK, A. L.: Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nov, Nr. 47, S. 44284–96
- [229] VOLLES, M. J. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 26, S. 7871–8
- [230] VOLLES, M. J. ; LEE, S. J. ; ROCHET, J. C. ; SHTILERMAN, M. D. ; DING, T. T. ; KESSLER, J. C. ; LANSBURY, Jr. P. T. P. T.: Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 26, S. 7812–9
- [231] WALSH, D. M. ; LOMAKIN, A. ; BENEDEK, G. B. ; CONDRON, M. M. ; TELOW, D. B.: Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 35, S. 22364–72
- [232] WEINGARTEN, M. D. ; LOCKWOOD, A. H. ; HWO, S. Y. ; KIRSCHNER, M. W.: A protein factor essential for microtubule assembly. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (1975), Nr. 5, S. 1858–62

- [233] WENNING, G. K. ; JELLINGER, K. A.: The role of alpha-synuclein in the pathogenesis of multiple system atrophy. In: *Acta Neuropathol* 109 (2005), Nr. 2, S. 129–40
- [234] WETZEL, R.: Ideas of order for amyloid fibril structure. In: *Structure* 10 (2002), Nr. 8, S. 1031–6
- [235] WINKLHOFER, K. F. ; TATZELT, J. ; HAASS, C.: The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. In: *EMBO J* 27 (2008), Nr. 2, S. 336–49
- [236] WISCHIK, C. M. ; NOVAK, M. ; THOGERSEN, H. C. ; EDWARDS, P. C. ; RUNSWICK, M. J. ; JAKES, R. ; WALKER, J. E. ; MILSTEIN, C. ; ROTH, M. ; KLUG, A.: Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988), Nr. 12, S. 4506–10
- [237] WOOD, S. J. ; WYPYCH, J. ; STEAVENSON, S. ; LOUIS, J. C. ; CITRON, M. ; BIERE, A. L.: alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 28, S. 19509–12
- [238] YAMAMOTO, A. ; SHIN, R. W. ; HASEGAWA, K. ; NAIKI, H. ; SATO, H. ; YOSHIMASU, F. ; KITAMOTO, T.: Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. In: *J Neurochem* 82 (2002), Nr. 5, S. 1137–47
- [239] YAMAZAKI, M. ; ARAI, Y. ; BABA, M. ; IWATSUBO, T. ; MORI, O. ; KATAYAMA, Y. ; OYANAGI, K.: Alpha-synuclein inclusions in amygdala in the brains of patients with the parkinsonism-dementia complex of Guam. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (2000), Nr. 7, S. 585–91
- [240] YAN, S. D. ; CHEN, X. ; SCHMIDT, A. M. ; BRETT, J. ; GODMAN, G. ; ZOU, Y. S. ; SCOTT, C. W. ; CAPUTO, C. ; FRAPPIER, T. ; SMITH, M. A. ; AL. et: Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), Nr. 16, S. 7787–91
- [241] YOSHIDA, H. ; IHARA, Y.: Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. In: *J Neurochem* 61 (1993), Nr. 3, S. 1183–6
- [242] ZHENG-FISCHHOFFER, Q. ; BIERNAT, J. ; MANDELKOW, E. M. ; ILLENBERGER, S. ; GODEMANN, R. ; MANDELKOW, E.: Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates

the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. In: *Eur J Biochem* 252 (1998), Nr. 3, S. 542–52

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anja Mehle, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einzelmolekülbasierte Analyse des Aggregationsverhaltens von Tau-Protein und sein Verhalten in der Koaggregation mit Alpha- Synuklein

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand